ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 17
1968

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 17 1968 NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1968, 17 (1), 5-51.

ÉTUDE SUR LA COMPOSITION DES CONCENTRÉS D'ARÔMES DE POMMES A CIDRE

C. POMPEI

Università di Perugia,
Istituto di Industrie agrarie,
S. Pietro, 06100-Perugia (Italie)

PLAN

INTRODUCTION.

I. — COMPOSITION DES SUBSTANCES VOLATILES DES POMMES, D'APRÈS LA LITTÉRATURE.

II. — ÉTUDE DU CONCENTRÉ D'ARÔME DE POMMES A CIDRE : TRAVAUX PERSONNELS

2. 1. — Appareils et méthodes.
2. 2. — Identification des substances volatiles de l'arôme.
2. 3. — Comparaison des concentrés d'arôme obtenus de trois appareils.
2. 4. — Discussion des résultats.

III. — MÉTHODES INDUSTRIELLES D'EXTRACTION DES ARÔMES.

3. 1. — Introduction.
3. 2. — Description des installations et prélèvement des échantillons.
3. 3. — Méthode d'analyse et de calcul.
3. 4. — Composition et comparaison des différentes fractions en fonction de leur origine.
3. 5. — Comparaison de l'efficacité des appareils.

CONCLUSION.

INTRODUCTION

Les arômes des fruits constituent un des facteurs importants de l'intérêt que leur portent les consommateurs. La transformation des fruits en produits alimentaires susceptibles de se conserver, si elle allonge la période de consommation, a souvent

Nous remercions très vivement les sociétés qui nous ont autorisé à prélever les échantillons d'arômes analysés dans ce travail : Société des jus de fruits EVA, Société des distilleries CORNIC.

pour effet d'altérer ou d'atténuer l'arôme ; celui-ci est en général très volatil et disparaît en partie ou en totalité lors des opérations successives de transformation, surtout si les fruits sont soumis à des évaporations.

Le premier intérêt que l'on a de récupérer des arômes à partir de fruits frais est de séparer les substances volatiles avant leur disparition, afin de pouvoir les réincorporer dans l'aliment.

L'addition de ces arômes aux jus concentrés et redilués, non autorisée en France, est permise dans d'autres pays. Les avantages de cette méthode, pour la conservation des qualités organoleptiques des jus, ont été montrés par les travaux de K. Wucherpfennig et G. Bretthauer (1962, 1963, 1964). Ces auteurs ont en effet comparé des jus conservés par divers procédés (BOHI, Filtration stérilisante, Pasteurisation) et conclu à la supériorité des jus obtenus par addition d'arômes préalablement extraits.

Depuis, le marché des concentrés d'arômes s'est partiellement détaché du marché des concentrés de jus. Il s'est développé et présente un grand intérêt pour revaloriser les excédents agricoles.

La composition des substances aromatiques des pommes a surtout été étudiée du point de vue physiologie végétale. On a déterminé les substances volatiles émises par ces fruits au cours de leur stockage. Ces études ont le plus souvent été effectuées sur des variétés de pommes à couteau ; par contre, il y a peu d'études sur les arômes industriels récupérés dans l'industrie des jus et concentrés de pommes.

Aussi nous avons pensé qu'il serait intéressant :

— d'une part, d'étudier la composition en substances volatiles de différents concentrés d'arômes obtenus industriellement à partir de pommes à cidre ou à jus ;

— d'autre part, de comparer les concentrés d'arômes obtenus par différents systèmes d'extraction sur le plan industriel, de rechercher les quantités de substances volatiles restant dans les jus ou les concentrés et celles perdues dans les eaux d'évaporation.

I. — COMPOSITION DES SUBSTANCES VOLATILES DES POMMES, D'APRÈS LA LITTÉRATURE

1. 1. *Substances émises par les pommes*

Les travaux les plus importants ayant été effectués sur les composés organiques volatils émis par les pommes, il est intéressant de les passer rapidement en revue. Avant que l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse ne se soit généralisé, des études approfondies ont été effectuées par les méthodes chimiques classiques, surtout par formation de dérivés cristallisés. F. E. Huelin (1952), D. F. Meigh (1956) et A. R. Thompson (1951) ont pu caractériser un grand nombre de constituants : alcools, esters, aldéhydes et cétones, dont la présence a été dans l'ensemble confirmée par les méthodes les plus modernes.

Ces dernières années, les substances émises par les pommes appartenant à diverses variétés de pommes à couteau ont fait l'objet d'études par chromatographie en phase gazeuse dont les résultats sont parfois variables en raison des différences des méthodes de prélèvement des échantillons gazeux : absorption sur charbon actif et désorption (K. H. Strackenbrock, 1961 ; N. Paillard, 1965), circulation d'air ou de gaz inerte

et piégeage à basse température, (J. W. Rhoades et J. D. Millar, 1965 ; D. F. Meigh, 1956-1957) ; des conditions de stockage, (G. Grevers et J. J. Doesburg, 1962, 1965) ; et des différents stades physiologiques des fruits ; l'importance du pic climactérique et les grandes variations des substances de l'arôme trouvées avant et après ce moment ont été mises en évidence par D. S. Brown, J. R. Buchanan et Hicks (1966). Les composés volatils déterminés par les auteurs ayant étudié les vapeurs émises par les pommes appartiennent pour la plus grande part aux esters, les alcools et les aldéhydes se trouvant en plus faible proportion. C'est donc aux esters que ces auteurs ont attribué l'odeur caractéristique de la pomme.

Strackenbrock (1961) a trouvé dans l'arôme de fruits mûrs de *Golden Delicious* une nette prédominance des esters suivants : propionate d'éthyle, acétate de butyle, acétate d'isoamyle, butyrate de butyle, acétate d'hexyle et une certaine quantité d'autres esters ; le butanol est l'unique alcool présent en quantité importante ; l'hexanal et peut-être l'acétone sont les seuls composés carbonylés détectés. Il trouve de grandes différences dans la composition des produits volatils des différentes variétés de pommes qu'il a étudiées et considère les chromatogrammes obtenus comme spécifiques de chaque espèce.

Paillard (1965) a étudié les pommes de la variété *Calville Blanc*, en vue de suivre l'émission de produits volatils à différents stades de la maturation ; l'auteur trouve d'importantes différences entre les pommes « vertes », « mûres » et « sénescentes », la teneur en produits volatils diminuant très fortement au cours de cette évolution à l'exception de l'alcool éthylique et de l'acétate d'éthyle. Dans les pommes mûres, on constate une prédominance de l'acétate de butyle, du butyrate de propyle et du butanol, et une teneur relativement importante en acétate d'hexyle. Les composés carbonylés présents sont l'acétaldéhyde et l'hexanal. Dans une autre étude sur l'atmosphère des chambres d'entreposage des pommes *Stayman* (Paillard, 1966), le butyrate d'éthyle et une substance inconnue sont les substances prédominantes.

Bien entendu, le fait que certaines substances soient en quantité importante, n'implique pas le fait qu'elles soient responsables de l'arôme particulier de la variété. A. E. Osman (1966) a trouvé presque identiques, à l'exception de deux substances non identifiées, dont un ester, les compositions en produits volatils du jus de pomme et de l'extrait de feuilles de pommiers. Il admet que les alcools ne sont présents qu'en traces dans la pomme à la fin du cycle végétatif et considère les esters comme les responsables du parfum. D'autre part, combinant une appréciation olfactive et la mesure des pics des substances à leur sortie de la colonne chromatographique, O. G. Guadagni, S. Okano et *al.* (1966) trouvent que l'odeur spécifique de la pomme est due à une substance qu'ils n'ont pas identifiée, ne donnant qu'un tout petit pic, par rapport aux autres substances apparaissant sur le chromatogramme.

1. 2. *Concentré d'arôme*

La grande différence entre les résultats trouvés par les chercheurs ayant étudié les émanations volatiles des pommes et ceux qui ont étudié les substances volatiles des jus par évaporation, consiste en ce que les premiers trouvent essentiellement des esters, avec une beaucoup plus faible teneur d'alcool et de composés carbonylés, les seconds essentiellement des alcools et des composés carbonylés, avec une beaucoup plus faible teneur d'esters. Drawert et *al.* (1965), tout en comparant les vapeurs émises par les pommes et les substances aromatiques du jus, donnent l'explication

de la présence de fortes quantités d'esters dans les premières et d'alcools dans les secondes : lors de l'écrasement des pommes, il se produit une action enzymatique responsable de la modification de l'arôme. Si on inhibe cette action, le chromatogramme du concentré d'arôme présente des pics d'esters très importants (acétate d'*iso*-butyle, de *n*-butyle, d'*iso*-amyle, d'amyle et d'hexyle) ; tandis que, au cours des traitements ordinaires, les esters sont scindés par des hydrolases en présence d'air. Les auteurs soulignent la différence entre l'arôme de fruit et l'arôme du jus de fruit.

D'où la difficulté éprouvée par les technologues à déterminer les corps responsables de l'arôme caractéristique de la pomme. Du reste, leur but étant souvent de déterminer la qualité des arômes obtenus industriellement plutôt que de connaître avec précision tous les constituants de l'arôme, beaucoup d'entre eux se sont contentés d'obtenir et de publier des chromatogrammes dont ils estimaient suffisant d'avoir l'image globale, sans identification précise des constituants. J. W. White (1950) a effectué par les méthodes chimiques classiques, une analyse détaillée de l'arôme de l'extrait de pomme *Mc Intosh* et *Stayman Winesap*, et trouvait que celui-ci était constitué par 92 p. 100 d'alcools (méthanol, éthanol, propanol, *iso*-propanol, butanol, 2-méthyl butanol, hexanol), 6 p. 100 de composés carbonylés (acétaldéhyde, acétone, hexanal, hexénal) et 2 p. 100 d'esters (essentiellement butyrate d'éthyle et caproate d'éthyle, avec de plus petites quantités d'autres esters). L'ensemble des constituants volatils représentait environ 50 p.p.m./l de jus.

Les résultats obtenus par A. Mehlitz et K. Gierschner (1961, 1962) diffèrent quelque peu de ceux de White ; néanmoins il faut tenir compte des différences de variété, d'origine et de maturité des fruits étudiés. Ils trouvent en effet que des composés d'arôme à haut point d'ébullition, se trouvant dans les pommes non mûres, se dégradent chez les pommes mûres en composés à faible point d'ébullition. Les différents auteurs sont d'ailleurs loin d'être d'accord à ce sujet (Paillard, 1965 ; Strackenbrock, 1961).

M. E. Kieser et A. Pollard (1962) notent également la prédominance des alcools (éthanol, *n*-butanol, *iso*-pentanol) et des aldéhydes (acétaldéhyde en particulier), et attribuent le parfum des pommes aux alcools de C_3 à C_6 et à leurs esters, présents en très faible quantité, sauf l'acétate de butyle. D'autres travaux ont été effectués sur les jus de pomme : H. Sugisawa, D. R. McGregor et J. S. Matthews avaient pour but d'étudier les produits volatils des jus de pomme (1964) et de les comparer avec ceux du cidre (1962) ; Strackenbrock (1962) a comparé la composition des vapeurs émises par les pommes avec les produits volatils du jus et du concentré d'arôme ; il trouve que les différences entre les variétés qu'il a établies pour les produits volatils émis se retrouvent dans les jus et les distillats d'arôme obtenus par distillation à 10 p. 100 et non par distillation de 25 p. 100 du jus, concentration pour laquelle on observe des altérations.

K. Nishimura et Y. Hirose (1964) ont étudié l'arôme obtenu industriellement à partir des pommes de la variété *Kogyoku*, et effectué une analyse poussée des différentes fractions de l'arôme, après leur séparation par extraction à l'éther et distillation fractionnée. Ils trouvent encore que les alcools sont les constituants les plus importants du point de vue quantitatif, mais attribuent l'arôme des pommes aux esters des alcools *n*-propylique, *n*-butylique, *n*-amylique et *n*-hexylique, quoique ceux-ci soient présents en quantité beaucoup plus faible.

J. Koch et H. Schiller (1964), au contraire, attribuent la plus grande importance aux composés carbonylés et particulièrement à l'hexénal ; l'odeur caractéristique du concentré d'arôme disparaissait si on précipitait les aldéhydes et réapparaissait par addition d'une faible quantité d'hexénal. Ils reconnaissent que le rôle des esters peut être aussi important dans l'arôme de pomme de table. E. Prillinger et H. Horwatitsch (1965) trouvent que les esters quantitativement les plus importants (acétate d'éthyle, de butyle, d'amyle) ne représentent encore qu'une petite fraction des alcools ; ils attribuent la faible teneur en esters de certains échantillons d'arôme à un mauvais fonctionnement de l'appareil d'extraction. D'après ces auteurs la différence de variété joue un rôle secondaire sur la composition du concentré d'arôme : c'est l'état des fruits qui présente la plus grande importance.

Ils observent d'importantes variations dans la teneur en hexénal qui est le constituant aromatique le plus intense et typique du jus de pomme, bien qu'il ne joue aucun rôle dans le parfum de pomme fraîche puisqu'il se forme lors de l'écrasement de la pomme en présence de l'air.

R. A. Flath et *al.* (1967) ont extrait un arôme du commerce par trois solvants : *iso*-pentane, éther, éther-*iso*-pentane (1 : 1 *v/v*). A l'aide de colonnes capillaires ils ont séparé 56 composés. En procédant à une évaluation olfactive à la sortie du détecteur non destructif spécialement utilisé dans ce but, ils ont trouvé que l'hexanal, l'hexen-2-al et le butyrate d'éthyle-2-méthyle étaient les principaux responsables de l'arôme.

II. — ÉTUDE DU CONCENTRÉ D'ARÔME DE POMMES A CIDRE

2. 1. Appareils et méthodes

Nous avons comparé la composition de quatre échantillons d'arômes extraits industriellement, venant de trois usines de Bretagne et du Perche traitant des pommes à cidre de variétés mélangées ; nos échantillons ont été pris en fin de campagne.

Les méthodes décrites ci-dessous nous ont également servi (voir 2e partie) à étudier la composition comparée des moûts à partir desquels sont obtenus ces arômes, ainsi que des concentrés, jus désaromatisés et petites eaux qui en proviennent.

Nous avons effectué cette étude par chromatographie en phase gazeuse, et utilisé diverses autres méthodes pour la vérification des résultats que nous obtenions.

2. 1. 1. *Appareillage*

Nous disposons :

— d'un Aérograph A 600 B avec détecteur à ionisation de flamme et programmeur de température, et d'un enregistreur Sefram Graphispot ;

— d'un Aérograph Auroprep 700 avec enregistreur Honey Well.

2. 1. 2. *Choix des colonnes et conditions de travail*

Nous avons travaillé dans les conditions suivantes :

— avec l'appareil A 600 : colonne 1/8", 10 pieds (3,30 m), Cromosorb W lavé à l'acide, 60-80 mesh, imprégné à 10 p. 100 de Carbowax 1540. Gaz vecteur : Azote R

à la pression de 20 psig, débit de 40 ml/m. Température de 50° à 100°C programmée à la vitesse de 2°C par minute.

Tous les chromatogrammes donnés dans le travail ont été obtenus dans ces conditions.

Nous avons également utilisé une colonne imprégnée à 10 p. 100 de DEGS en vue de vérifier les résultats obtenus avec la colonne de Carbowax 1540 ; cette colonne, quoique de polarité comparable, donne cependant des temps de rétention assez différents. En effet, des essais effectués avec des colonnes non polaires (Silicone SE 30, Apiezon L, etc.) ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants.

— Avec l'Autoprep : colonne 3/8", 10 pieds, Cromosorb W lavé à l'acide, 60-80 mesh, imprégné à 30 p. 100 de DEGS. Gaz vecteur : H_2 à la pression de 1,5 kg, débit : 50 ml/mn. Température : 50 à 120°C programmée manuellement à la vitesse de 5°C/mn.

2. 1. 3. *Injection de l'échantillon*

Nous avons procédé de trois manières différentes.

a) Par injection directe sur la colonne du concentré d'arôme, ce qui nous a permis d'éviter toute espèce de pertes, mais en revanche ne permet pas l'élimination de la quantité relativement importante d'alcool éthylique.

En général, nous avons injecté 3 µl du concentré d'arôme.

b) Par injection de la vapeur prélevée dans l'atmosphère en équilibre avec les échantillons du concentré d'arôme (head space technique), méthode qui, en présence d'eau, révèle les esters et les composés carbonylés avec une sensibilité beaucoup plus grande que les alcools (W. W., Nawar, 1966) :

5 ml de l'échantillon dans une fiole de 50 ml ont été saturés par 3 g de SO_4Na_2 anhydre et après agitation sont laissés 10 mn à la température de la pièce (20°C). En général, 2 ml de gaz ont été injectés à l'aide d'une seringue étanche aux gaz.

c) Par injection d'extraits éther-pentane. Les substances d'arôme des fractions prélevées à différents stades de la concentration (moût, jus désaromatisé, eaux, etc...) ont été extraites par le mélange éther-pentane (2 : 1 v/v) qui a l'avantage d'extraire peu d'alcool éthylique et d'eau, mais qui a l'inconvénient de masquer les pics des substances les plus volatiles et d'entraîner, lors de la concentration de l'extrait, des pertes de substances à faible point d'ébullition.

Nous avons purifié soigneusement le solvant par séchage sur Na métal suivi de plusieurs distillations, jusqu'à ce que le résidu d'évaporation ne montre plus, par chromatographie en phase gazeuse, de pics de substances étrangères.

L'extraction a été faite en discontinu dans des ampoules à décanter de 2 litres en agitant des fractions de 1 250 ml du liquide à extraire avec 5 fois 150 ml du mélange éther-pentane. Après la cinquième extraction nous avons constaté que l'extraction des substances volatiles n'était pas terminée, mais nous n'avons pas cherché à donner des résultats quantitatifs ; nous avons seulement pris soin d'opérer dans les mêmes conditions.

2. 1. 4. *Identification des pics obtenus*

Nous avons utilisé les méthodes suivantes :

a) comparaison des temps de rétention des différentes substances avec ceux des substances témoins, ajoutées comme étalons internes, sur colonnes de Carbowax 1 540 et de DEGS ;

b) caractérisation des groupes fonctionnels : l'addition des différents réactifs, permettant la disparition de composés présentant certains groupes fonctionnels, a été faite sur des échantillons étudiés ensuite par la « head space technique » ce qui permettait d'éviter toute contamination de la chambre d'injection.

— Élimination des alcools : 150 µl de l'extrait éther-pentane de l'arôme sont additionnés d'un excès de chlorure de 3,5 dinitrobenzoyle en présence de pyridine ; après ébullition sous reflux, la pyridine en excès est neutralisée par quelques gouttes de HCl dilué, et le mélange est agité dans une ampoule à décanter avec une petite quantité d'eau distillée. La phase organique est alors chromatographiée par injection directe (J. W. White, 1950).

— Élimination des composés carbonylés : 5 ml de l'échantillon de concentré d'arôme sont additionnés de 3 g de SO_4Na_2 anhydre et de 0,3 ml d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine acide préparée en traitant 0,2 g de $NH_2OH \cdot HCl$ avec 2 ml de NaOH N et en diluant à 10 ml avec de l'eau distillée (R. Bassette, S. Ozeris, C. H., Whitnah, 1962).

— Élimination simultanée des composés carbonylés et des esters : 5 ml de l'échantillon, saturée par le SO_4Na_2 anhydre, ont été additionnés de 0,3 ml d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine basique préparée par dissolution de 0,2 g de $NH_2OH \cdot HCl$ dans 10 ml de NaOH N (R. Bassette, S. Ozeris, C. H. Whitnah, 1962).

— Élimination des composés insaturés : 5 ml de l'échantillon, saturés par le SO_4Na_2 anhydre, ont été additionnés de 3 ml d'une solution saturée de $KMnO_4$. La réaction est complète après une heure (J. E. Hoff, E. D., Feit, 1963).

— Distinction entre les aldéhydes et les cétones : cette même addition de $KMnO_4$ concentré provoque la disparition des aldéhydes, mais non celle des cétones. Cette réaction est plus lente que la précédente (J. E., Hoff, E. D., Feit, 1963).

— Mise en évidence des hydrocarbures : l'addition de 5 ml de SO_4H_2 concentré à l'échantillon saturé provoque la disparition de tous les pics autres que les hydrocarbures saturés (J. E. Hoff., E. D. Feit, 1963).

— Mise en évidence des composés soufrés : 5 ml de l'échantillon sont traités par 0,5 g de chlorure mercurique ; après une heure d'agitation à la température de la pièce, l'échantillon est saturé par SO_4Na_2 et, une fois équilibré, étudié par « head space technique » (R. Basssette, S. Ozeris, C. H. Whitnah, 1963).

— Nous avons cherché à mettre à profit la propriété que possède l'eau de changer les temps de rétention des composés polaires, ce qui a été également signalé par Mehlitz et *al.* (1964) mais considéré par eux comme un inconvénient.

Nous nous sommes aperçus que le changement apporté par addition d'eau était tout à fait reproductible et que l'eau avait pour effet de retarder les pics des alcools et d'avancer ceux des esters. Ceci nous a été utile pour la caractérisation de certains pics, pour la mise en évidence des pics masqués par d'autres et pour la comparaison

des échantillons aqueux et des échantillons dans l'éther-pentane, ce qui évite, dans une certaine mesure, les comparaisons sur une autre colonne. Cette observation nous porte à croire que les « pics fantômes » signalés par certains auteurs, F. PRILLINGER, H. HORWATITSCH (1965), dans des échantillons aqueux, correspondent en réalité à une séparation de substances effectivement présentes.

Pratiquement nous avons fait précéder l'introduction de l'échantillon, gazeux ou liquide, par l'injection de 10 fois 1 µl en 10 minutes (1 µl/mn).

c) Séparation du concentré d'arôme en différentes fractions, grâce à l'Autoprep. Nous avons injecté dans la colonne la phase organique que nous avons séparée d'un échantillon particulièrement riche (lavage de gaz) par saturation avec le CO_3K_2 ; étant donné la complexité des chromatogrammes, nous n'avons pu séparer les constituants isolément, mais par groupes : nous avons recueilli 8 fractions différentes, par piègeage dans l'azote liquide et nous les avons étudiées au moyen de l'appareil A 600 B sur les colonnes de Carbowax 1540 et de DEGS.

d) Formation de dérivés cristallisés.

Précipitation des composés carbonylés par la 2,4 dinitrophénylhydrazine. Nous avons utilisé la méthode de VOGEL (1959) en ajoutant au concentré d'arôme une solution en excès de 2,4 dinitrophénylhydrazine (0,25 g dans un mélange : HCl 42 ml, eau distillée 50 ml, le tout amené à 250 ml). Après séparation du précipité cristallisé, celui-ci a été, selon le cas, étudié par trois méthodes différentes :

— par chromatographie en couche mince de Kielselgel G, en utilisant comme solvant l'heptane saturé de méthanol. Les taches apparaissent en jaune et peuvent être renforcées en lumière UV (O. F. MEIGH, 1956) ;

— par spectrophotométrie en UV après dissolution dans le méthanol et dilution dans le chloroforme ;

— par chromatographie en phase gazeuse, après régénération à l'acide lévulinique, suivant la méthode de KEENEY (1957) reportée par LOVE et BRATZLER (1966) légèrement modifiée : le précipité de dinitrophénylhydrazones, venant de 20 ml de concentré d'arôme, est additionné de 10 ml d'acide lévulinique et de 1 ml de HCl 2N, le mélange est mis dans un ballon à distiller et chauffé dans un bain d'huile de silicone jusqu'à 160°C ; le distillat est recueilli dans un tube plongé dans un mélange réfrigérant à — 10°C ; on recueille environ 0,8 ml qu'on analyse par chromatographie en phase gazeuse par injection de la vapeur prélevée dans l'atmosphère en équilibre avec l'échantillon.

2. 2. IDENTIFICATION DES SUBSTANCES VOLATILES DE L'ARÔME

Nous avons fait l'analyse comparative des arômes de trois usines (A, B, C), l'usine A nous ayant fourni des échantillons de concentré d'arôme, d'une part de pommes douces (A_1), d'autre part de pommes aigres (A_2).

Nous avons également utilisé les renseignements obtenus grâce à des échantillons particulièrement riches en substances d'arôme, consistant en la fraction « lavage de gaz » qui, comme nous avons pu le voir, possédait la même composition que l'arôme, mais était 10 fois plus riche.

La figure 1 représente le chromatogramme obtenu par injection d'un échantillon liquide de l'arôme provenant de l'usine (C) (3,5 µl), la figure 2, par injection de la vapeur prélevée dans l'atmosphère en équilibre avec le même échantillon (2 ml de gaz).

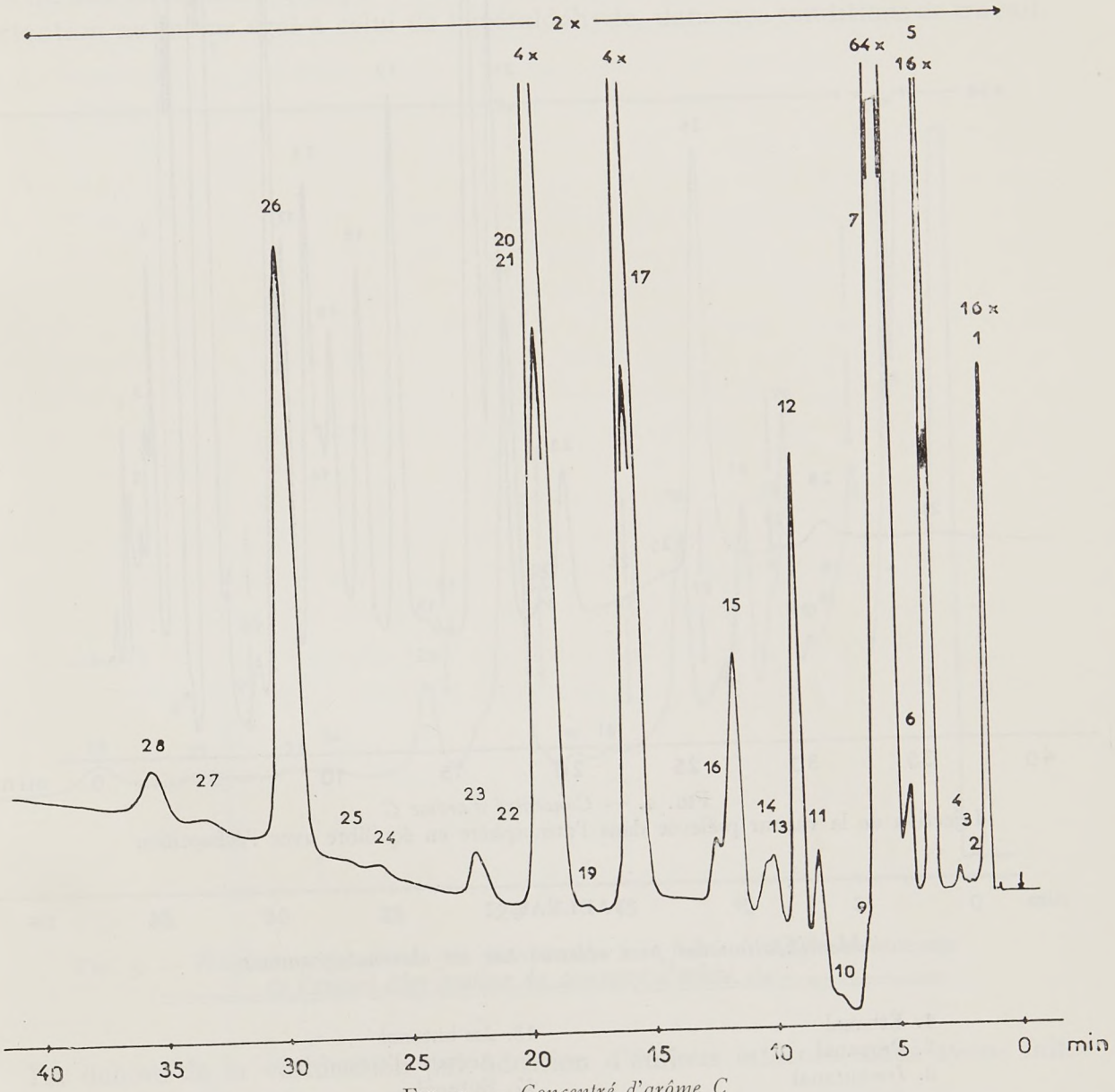


FIG. 1. — *Concentré d'arôme C*
Injection directe de l'échantillon

La teneur en eau de l'échantillon liquide (plus de 90 p. 100 de la quantité injectée) explique (nous avons déjà mentionné ce fait) les différences des temps de rétention relatifs des alcools et des esters, par rapport à ceux observés dans le chromatogramme de l'atmosphère, qui montre une meilleure séparation des pics ; l'hexénal par exemple n'apparaît pas sur le chromatogramme de l'échantillon liquide, il est cependant présent, quoique, dans ce cas, recouvert par le pic d'*iso*-pentanol : nous mettons cela en évidence en comparant les chromatogrammes N° 1 et N° 2, d'autre part en effectuant une injection de 10 µl d'eau, selon la méthode indiquée plus haut, qui fait avancer encore le pic d'*iso*-pentanol, et fait apparaître l'aldéhyde.

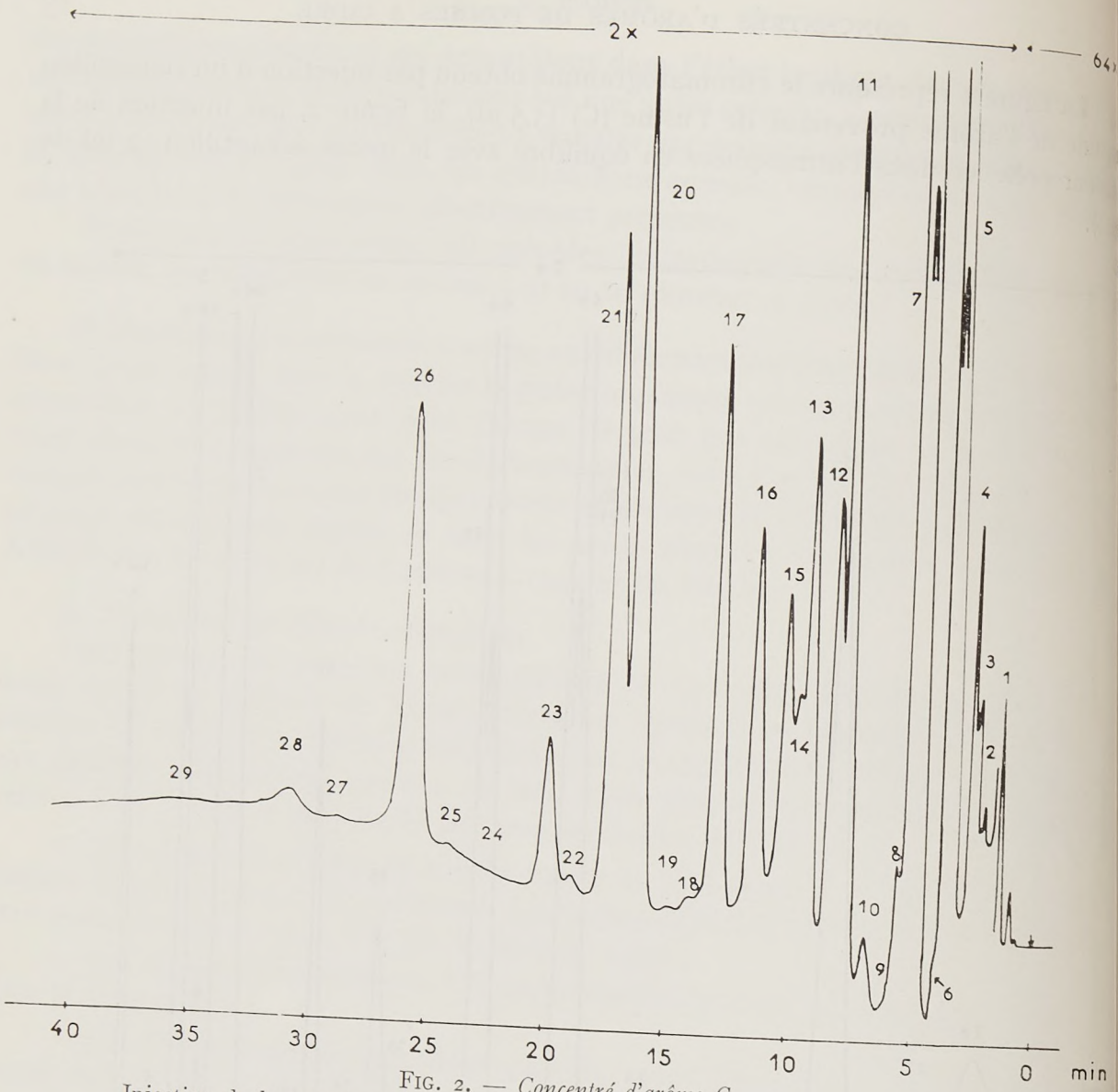


FIG. 2. — *Concentré d'arôme C*
Injection de la vapeur prélevée dans l'atmosphère en équilibre avec l'échantillon

TABLEAU I

Identification des pics obtenus sur les chromatogrammes

1. Éthanal
2. Propanal
3. *Iso*-butanal
   Acétone
4. Butanal
   Acétate de méthyle
5. Acétate d'éthyle
6. Acétate d'*iso*-propyle
   Méthanol
7. *Éthanol*
   Proprionate d'éthyle
8. Butyrate de méthyle
   Acétate de propyle
9. Pic non identifié
10. Acétate d'*iso*-butyle
11. Butyrate d'éthyle
12. Propanol
13. Acétate de butyle
14. Hexanal
15. *Iso*-butanol
    Acétate d'*iso*-amyle
17. Butanol
18. Valérianate d'éthyle
19. Propionate d'amyle
    Iso-pentanol
20. Valérianate de propyle
    Caproate d'éthyle
    Butyrate de butyle
21. Hexénal
22. Pentanol
23. Acétate d'éthyle
24. Pic non identifié
25. Propionate d'hexyle
26. Hexanol
27. Hexénol
28. Caproate de butyle
29. Pic non identifié

Dans le tableau I, nous avons porté les résultats de la caractérisation des ics, déterminée par les méthodes précédemment décrites.

Les substances gazeuses qui ne sont condensables qu'à très basse température éthylène) ne rentrent pas dans le cadre de notre étude. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux substances qui, par chromatographie en phase gazeuse, ont un temps le rétention au moins égal à celui de l'acétaldéhyde, dans nos conditions de travail.

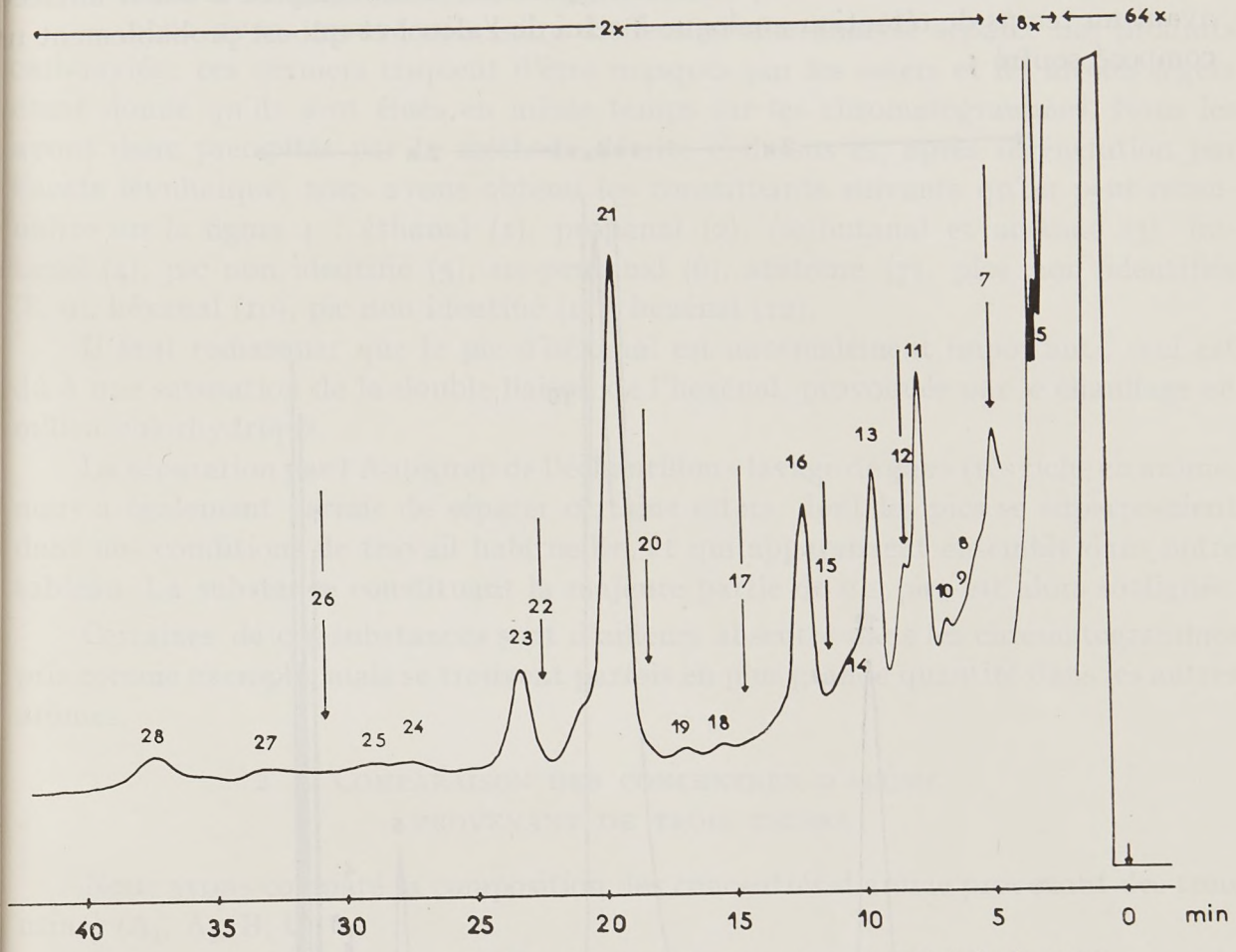


FIG. 3. — *Élimination des alcools par précipitation sous forme de 3,5-dinitrobenzoates de l'extrait éther-pentane du concentré d'arôme* A_2

En dehors de la vérification par addition d'étalons internes, nous avons fait les constatations suivantes :

— par action du chlorhydrate d'hydroxylamine acide, on observe la disparition des pics suivants : N° 1, 2, 3, 4 (partiel), 14, 21, qui sont des composés carbonylés ;

— par action du chlorhydrate d'hydroxylamine basique, on observe la disparition des pics 1 à 5, 6 (partiellement), 8 à 11, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 23 à 25, 28, 29, qui sont donc, soit des composés carbonylés, soit des esters ;

— par formation et élimination des alcools sous forme de 3,5 dinitrobenzoates, les pics 6 (partiellement), 7, 12, 15, 17, 20, 22, 24, 27 disparaissent effectivement sans qu'on observe de modification en ce qui concerne les autres pics (fig. 3) ;

— sous l'action d'une solution saturée de $KMnO_4$ après 1 heure les pics 21 et 27, composés insaturés, disparaissent après un plus long temps de réaction, on constate

la disparition des pics précédemment déterminés comme étant des composés carb nylés, sauf une partie du pic 3, qui est donc partiellement donné par une cétone ;

— sous l'action du SO_4H_2 concentré, tous les pics disparaissent, ceci nous a do amené à conclure à l'absence d'hydrocarbures saturés ;

— par addition de Cl_2Hg, on ne remarque aucune disparition de pic, donc on peut mettre en évidence la présence de composés soufrés; cependant l'examen olfact à la sortie de la colonne nous a montré la présence d'un composé à odeur alliacé ayant un temps de rétention analogue à celui de l'alcool et qui est probablement u composé soufré ;

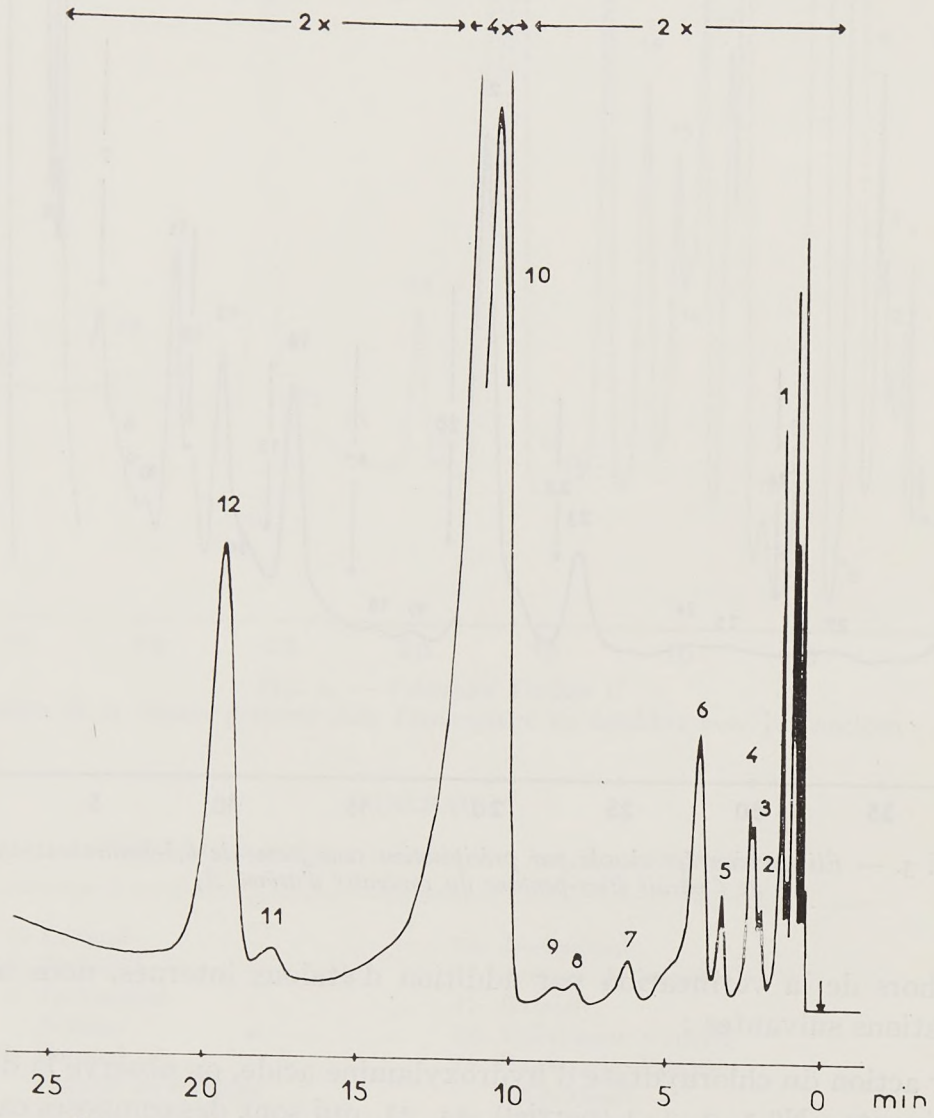


FIG. 4. — *Régénération des produits carbonylés par l'acide lévulinique à partir des 2,4-dinitrophénylhydrazones*

— enfin, nous avons pu mettre en évidence la présence d'acétal (qui n'apparaît pas sur les chromatogrammes) de la manière suivante : nous avons, grâce à l'Autoprep, isolé la fraction correspondant aux pics allant de l'acétate d'éthyle jusqu'au butyrate de méthyle (fraction 2), en supposant que l'important pic d'alcool pouvait masquer un certain nombre de substances. Sur cette fraction ont été effectuées les réactions des aldéhydes : d'une part, un essai de coloration à l'*o*-dianisidine (F. FEIGL,

1959) qui donnait un résultat négatif ; d'autre part, une précipitation par la 2,4 dinitrophénylhydrazine, qui donnait en revanche un abondant précipité. Celui-ci étudié par chromatographie en couche mince et par spectrophotométrie en UV, montrait les caractéristiques de l'acétaldéhyde. Ceci montre la présence d'acétal hydrolysé en ses constituants par l'acide chlorhydrique de la solution de 2,4-dinitrophényl hydrazine. L'examen olfactif à la sortie de la colonne donnait du reste une preuve supplémentaire de la présence de cette substance ;

— nous avons trouvé nécessaire d'effectuer une analyse séparée des produits carbonylés ; ces derniers risquent d'être masqués par les esters et les alcools légers étant donné qu'ils sont élués en même temps sur les chromatogrammes. Nous les avons donc précipités par la méthode décrite ci-dessus et, après régénération par l'acide lévulinique, nous avons obtenu les constituants suivants qu'on peut reconnaître sur la figure 4 : éthanal (1), propanal (2), *iso*-butanal et acétone (3), butanal (4), pic non identifié (5), *iso*-pentanal (6), acétoïne (7), pics non identifiés (8, 9), héxanal (10), pic non identifié (11), hexénal (12).

Il faut remarquer que le pic d'héxanal est anormalement important ; ceci est dû à une saturation de la double liaison de l'hexénal, provoquée par le chauffage en milieu chlorhydrique.

La séparation par l'Autoprep de l'échantillon « lavage de gaz » très riche en arôme, nous a également permis de séparer certains esters, dont les pics se superposaient dans nos conditions de travail habituelles, et qui apparaissent ensemble dans notre tableau. La substance constituant la majeure partie de ces pics est alors soulignée.

Certaines de ces substances sont d'ailleurs absentes dans les chromatogrammes pris comme exemple, mais se trouvent parfois en plus grande quantité dans les autres arômes.

2. 3. Comparaison des concentrés d'arôme provenant de trois usines

Nous avons comparé la composition des concentrés d'arôme provenant des trois usines (A_1, A_2, B, C).

On constate que la composition de ces arômes est voisine (voir tabl. 2, 3), la principale différence portant sur les proportions relatives d'acétate de butyle, hexanal et *iso*-butanol. Ce ne sont cependant que des différences minimes. Bien que les arômes ne soient pas obtenus à partir de variétés pures, on est bien loin cependant des différences trouvées par Strackenbrock dans son étude sur les substances émises par les pommes (1961).

Pour l'analyse des échantillons injectés à l'état liquide, les chiffres indiqués (donnés en « cm/ml de moût »), ont été calculés d'après la quantité injectée, la hauteur des pics et l'atténuation, en appliquant un facteur de correction dépendant de la concentration de l'arôme.

Par exemple, pour l'arôme de l'usine C : le moût est concentré 200 fois (200 litres de moût donnent un litre d'arôme) et on a effectué une injection de 3 µl. La valeur indiquée dans le tableau est de :

$$h_{corr} = \frac{h_{pic} \times 1\,000}{3 \times 200}$$

soit $h_{corr} = h_{pic} \times 1{,}67$, pour le concentré d'arôme de cette usine.

Pour l'analyse des échantillons gazeux, on n'a pu faire qu'une notation comparative entre les différents échantillons, les résultats obtenus n'étant pas suffisamment reproductibles.

TABLEAU 2

Analyse des constituants volatils des concentrés d'arôme

Analyse directe des échantillons liquides

	A_1	A_2	B	C
Éthanal	156,4	190,0	160,5	144,2
Propanal	2,1	1,6	1,6	1,6
Iso-butanal	2,0	1,5	—	1,4
Acétone				
Butanal	4,1	3,4	3,0	3,6
Acétate de méthyle				
Acétate d'éthyle	133,2	140,0	72,1	126,5
Acétate d'*iso*-propyle	15,7	22,8	17,5	14,5
Méthanol				
Éthanol	> 1 000,0	> 1 150,0	> 1 150,0	> 850,0
Propionate d'éthyle				
Butyrate de méthyle	—	—	—	—
Acétate de propyle				
Pic non identifié	—	—	—	—
Acétate d'*iso*-butyle	traces	traces	—	traces
Butyrate d'éthyle	3,4	6,1	2,3	4,3
Propanol	29,4	23,5	17,1	17,0
Acétate de butyle	3,6	4,0	0,6	2,5
Hexanal	2,4	2,5	1,3	2,1
Iso-butanol	12,7	11,4	8,9	8,8
Acétate d'*iso*-amyle	3,4	4,0	1,3	1,7
Butanol	43,2	38,9	31,7	37,2
Valérianate d'éthyle	0	traces	0	0
Propionate d'amyle	0,2	0,2	0,2	0,1
Iso-pentanol				
Valérianate de propyle	47,5	47,1	39,9	40,0
Caproate d'éthyle				
Butyrate de butyle				
Hexénal	*8,9	*10,2	*8,6	*7,0
Pentanol	1,9	1,5	1,1	1,7
Acétate d'hexyle	traces	0	0	0
Pic non identifié	0,5	0,6	0,6	0,4
Propionate d'hexyle	traces	traces	traces	traces
Hexanol	20,2	17,5	17,5	20,8
Hexénol	0,5	0,6	0,8	0,3
Caproate de butyle	2,2	2,5	2,1	1,5
Pic non identifié	0	0	0	0

Le signe (*) indique que le pic a été mis en évidence par injection supplémentaire d'eau.
Le signe (—) indique que le pic est masqué par un autre pic, donc on ne peut être sûr de sa présence.
Le signe (0) indique que le pic n'est pas présent.

2. 4. Discussion des résultats

Les résultats de nos analyses concordent dans l'ensemble avec ceux des auteurs qui, ayant étudié les concentrés d'arôme, trouvent que ceux-ci sont, du point de vue quantitatif, constitués pour la majeure partie par des alcools. Cependant nous

retrouvons, également par la technique de l'analyse de la vapeur en équilibre avec l'échantillon, la plupart des esters signalés dans les vapeurs émises par les pommes, quoique leurs proportions relatives puissent être extrêmement différentes : il est vrai qu'il faut tenir compte des différences importantes dues à la variété, à la maturité

TABLEAU 3

Analyse des constituants volatils des concentrés d'arôme

Analyse de la vapeur prélevée dans l'atmosphère en équilibre avec l'échantillon

	A_1	A_2	B	C
Éthanal	++++	+++	++++	++++
Propanal	+	+	+	+
Iso-butanal	++	+	—	++
Acétone				
Butanal	++	++	+	+++
Acétate de méthyle				
Acétate d'éthyle	++++	++++	++++	++++
Acétate d'*iso*-propyle	+	traces	+	traces
Méthanol				
Éthanol	++++	++++	++++	++++
Propionate d'éthyle				
Butyrate de méthyle	traces	traces	traces	traces
Acétate de propyle				
Pic non identifié	—	—	—	—
Acétate d'*iso*-butyle	+	+	traces	+
Butyrate d'éthyle	+++	+++	+++	++++
Propanol	+++	+++	++	+++
Acétate de butyle	+++	+++	++	+++
Hexanal	++	++	++	++
Iso-butanal	+++	++	++	+++
Acétate d'*iso*-amyle	+++	+++	++	+++
Butanol	+++	++	+++	+++
Valérianate d'éthyle	—	—	traces	traces
Propionate d'amyle	traces	—	traces	traces
Iso-pentanol				
Valérianate de propyle	+++	+++	+++	+++
Caproate d'éthyle				
Butyrate de butyle				
Hexénal	+++	+++	++++	+++
Pentanol	++	traces	+	++
Acétate d'hexyle	traces	++	traces	traces
Pic non identifié	traces	traces	traces	traces
Propionate d'hexyle	traces	traces	traces	traces
Hexanol	++	++	++	+++
Hexénol	traces	traces	traces	traces
Caproate de butyle	traces	+	+	+
Pic non identifié	—	traces	traces	—

et aux conditions de stockage des pommes. Nous avons cependant mis en évidence un plus grand nombre d'aldéhydes qu'il n'en apparaît généralement dans les publications déjà citées.

Le rôle des aldéhydes est en général considéré comme important : pour K.Wucherpfennig et G. Bretthauer (1963, 1964) ce sont les constituants les plus fragiles qui s'altèrent le plus vite dans de mauvaises conditions de traitement ou de conservation du jus.

Leur rôle est cependant controversé, en particulier celui des aldéhydes en C_6 : hexanal et hexénal.

L'hexénal n'a pas été trouvé dans les vapeurs émises par les pommes (K. H. Strackenbrock, 1961 ; N. Paillard, 1965, 1966), tandis que l'hexanal semble habituellement présent. Drawert et *al.* (1965) comparant les vapeurs émises par les pommes et les concentrés d'arôme de ces mêmes pommes, ne trouvent d'hexanal et d'hexénal que dans ces derniers : ces aldéhydes proviendraient d'une oxydation enzymatique ayant lieu lors de la destruction de la paroi cellulaire, fait général chez les végétaux. M. Gottauf et R. Duden (1965) confirment les résultats de F. Drawert et *al.*, constatant que les deux aldéhydes se forment si le jus reste en contact avec les parties solides de la pomme, et atteignent un maximum après 5mn de contact. Cependant J. Koch et H. Schiller (1964) les considèrent comme caractéristiques de l'arôme de la pomme. En ce qui nous concerne, nous avons trouvé dans tous les arômes l'hexanal et l'hexénal, ce dernier toujours en quantité importante. En revanche, comme nous le verrons plus loin, ils sont tous deux absents dans nos moûts, ou présents en traces. Nous ne pouvons cependant tirer de conclusion quant à son importance du point de vue de la qualité de l'arôme.

En effet, d'après l'examen olfactif des différentes fractions séparées par l'Autoprep, l'odeur propre de la pomme est discernée dans la fraction N° 3, qui renferme : acétate d'*iso*-butyle, butyrate d'éthyle, propanol, acétate de butyle, hexanal et *iso*-butanol. L'hexénal, toujours en quantité beaucoup plus importante que l'hexanal, n'apparaît que dans la fraction N° 6.

III. — MÉTHODES INDUSTRIELLES D'EXTRACTION DES ARÔMES

3. 1. Introduction

La deuxième partie de notre travail consistait à suivre l'évolution de la composition de l'arôme au cours des différentes opérations de la récupération et à déceler les pertes qui pouvaient éventuellement se produire aux diverses étapes du processus en vue de comparer l'efficacité de différents types d'extracteurs.

Un travail analogue a été fait par A. Mehlitz et *al.* (1964) sur un appareil Brunner-Sutter (analogue à celui de l'usine A), utilisé d'une part à la récupération des constituants de solutions modèles (4 composés carbonylés, 3 alcools et 1 ester), d'autre part à l'extraction des arômes du jus de pommes. L'extraction des constituants de la solution modèle était pratiquement complète ; mais le cas du jus de pomme est très différent ; on retrouve dans l'arôme tous les pics présents dans le moût, à peu près dans le même rapport, donc la majeure partie d'entre eux n'a pas subi d'altération. En revanche, même dans l'essai le plus favorable, on retrouve, dans le jus après désaromatisation, tous les pics (sauf 3) constitutifs du concentré d'arôme.

Un schéma général de l'extraction est donné dans le tableau 4.

Nous avons comparé les installations suivantes :

usine A : système Brunner-Sutter
usine B : système Unipectine
usine C : système Wiegand

dont nous allons décrire les principales caractéristiques et indiquer les endroits de prélèvement d'échantillons.

TABLEAU 4

Schéma de l'extraction des arômes

Moût sortant des presses (= 100)	Arôme gaz (10)	Arôme (1 litre provenant de 150-200 l de moût (0,5) Petites eaux (bas de la colonne) (9,5) Gaz non condensables (lavage des gaz) (0,003)	
	Jus dépectinisé et collé (90)	Concentré	(12,5)
		Eaux évaporées du 1er corps (condensées dans le 2e) Eaux évaporées dans le 2e corps (condensées dans le 3e) Eaux évaporées dans le 3e corps (condensées : — pompe à vide ou — condenseur barométrique	(77,5)

Nous avons dans tous les cas appelé :

— moût : jus des pommes tel qu'il sort des presses ;
— jus : jus de pomme, après désaromatisation ;
— petites eaux : résidu d'extraction des arômes, séparé dans le bas de la colonne à rectifier ;
— lavage de gaz : liquide condensé et récupéré après lavage des gaz qui s'échappent du condenseur situé après la colonne à rectifier ;
— jus concentré : jus sortant des évaporateurs, ayant perdu une plus ou moins grande partie de son eau ;
— concentré d'arôme : arômes récupérés après concentration et rectification ;
— eaux de l'évaporateur : eaux du concentrateur = eaux évaporées lors de l'évaporation du jus, puis condensées.

Nous avons effectué des prélèvements de cinq litres pour les moûts, jus, petites eaux, eaux du concentrateur, de 2 litres pour les jus concentrés et de 500 ml pour les concentrés d'arôme.

3. 2. Description des installations
Prélèvement et conservation des échantillons

a) *Usine A*

La matière première est constituée soit par des mélanges de pommes douces (A_1), soit par des pommes aigres (A_2). Dans les deux cas l'appareillage pour la récupération d'arôme est du type Brunner-Sutter. La concentration du jus se fait par un appareil à triple effet à faisceaux tubulaires horizontaux.

1. *Récupération de l'arôme* (fig. 5).

Le schéma général de fonctionnement est le suivant : le moût (*a*), qui sort des presses à une température de 12°-15°, est pasteurisé dans un échangeur de chaleur (2) par le jus désaromatisé qui sort du séparateur de vapeur (4). La pasteurisation se fait

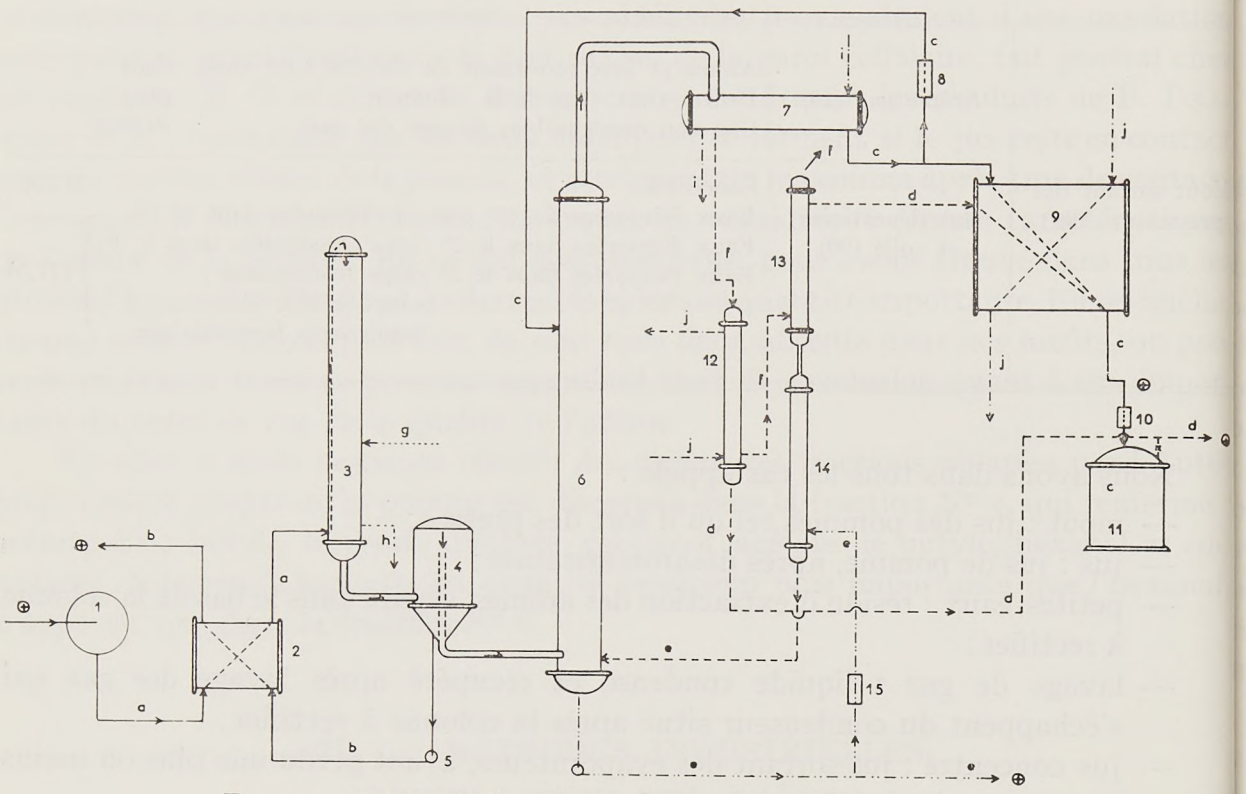


FIG. 5. — *Schéma de l'installation de récupération d'arôme de « A »*
(Système Brunner-Sutter)

1. Pompe à moût
2. Échangeur de chaleur
3. Évaporateur
4. Séparateur de vapeur
5. Pompe à jus chaud
6. Colonne à rectifier
7. Condenseur
8. Débimètre à reflux
9. Refroidisseur à eau glacée
10. Débimètre à arômes
11. Cuve tampon de récupération du concentré d'arôme
12. Refroidisseur à eau glacée
13. Colonne à rectifier à anneaux de Raschig
14. Chauffage pour récupération d'arôme des gaz non condensables
15. Débimètre des petites eaux

a) Moût
b) Jus désaromatisé
c) Concentré d'arôme
d) Arôme récupéré au lavage des gaz non condensables
e) Petites eaux
f) Gaz non condensables
g) Vapeur vive
h) Sortie vapeur
i) Eau froide
j) Eau glacée

⊕ Prélèvement échantillon

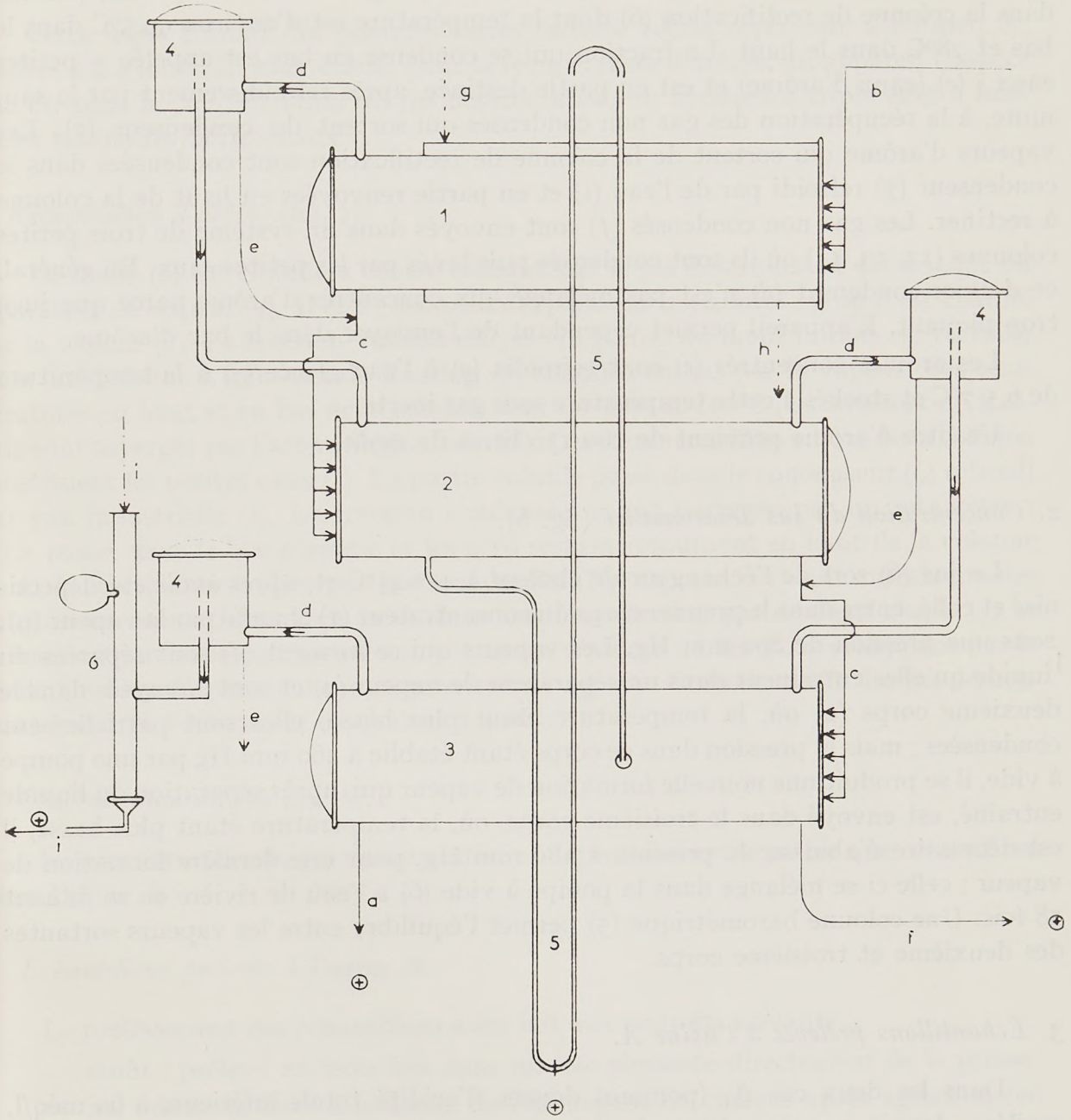


FIG. 6. — *Schéma de l'installation de concentration du jus de « A » et « B »*

1. Premier corps du concentrateur
2. Deuxième corps du concentrateur
3. Troisième corps du concentrateur
4. Séparateur de vapeur
5. Tube d'équilibrage des pressions
6. Condenseur barométrique

a) Concentré de jus de pommes
b) Jus dépectinisé, collé, filtré
c) Jus en cours de concentration
d) Vapeurs provenant de l'évaporation du jus
e) Vapeurs condensées dans les séparateurs de vapeur
f) Vapeurs condensées dans les premier et deuxième corps
g) Vapeur vive
h) Sortie vapeur
i) Eau froide
⊕ Prélèvement échantillon

à 94°C. Le vaporisateur (3) est vertical et chauffé par de la vapeur vive (9). Les substances volatiles entraînées par les vapeurs du jus (10 p. 100 du moût initial) passent dans la colonne de rectification (6) dont la température est d'environ 99,5°C dans le bas et 78°C dans le haut. La fraction qui se condense en bas est appelée « petites eaux » (*e*) (eaux d'arôme) et est en partie destinée, après refroidissement par la saumure, à la récupération des gaz non condensés qui sortent du condenseur (7). Les vapeurs d'arôme qui sortent de la colonne de rectification sont condensées dans le condenseur (7) refroidi par de l'eau (*i*) et en partie renvoyées en haut de la colonne à rectifier. Les gaz non condensés (*f*) sont envoyés dans un système de trois petites colonnes (12, 13, 14) où ils sont condensés puis lavés par les petites eaux. En général ce dernier condensat (*d*) n'est pas mélangé aux concentrés d'arôme parce que jugé trop piquant. L'appareil permet cependant de l'envoyer dans le bac d'arôme.

Les arômes concentrés (*c*) sont refroidis (*q*) à l'eau glacée (*j*) à la température de 6,5-7°C et stockés à cette température sous gaz inerte.

Un litre d'arôme provient de 160-170 litres de moût.

2. *Concentration du jus désaromatisé* (fig. 6).

Le jus (6) sort de l'échangeur de chaleur à 42°-45°C et, après avoir été dépectinisé et collé, entre dans le premier corps du concentrateur (1) chauffé par la vapeur (9) sous une pression de 800 mm Hg. Les vapeurs qui se forment (*d*) sont séparées du liquide qu'elles entraînent dans un séparateur de vapeur (4) et sont envoyées dans le deuxième corps (2) où, la température étant plus basse, elles sont partiellement condensées ; mais la pression dans ce corps étant établie à 460 mm Hg par une pompe à vide, il se produit une nouvelle formation de vapeur qui, après séparation du liquide entraîné, est envoyé dans le troisième corps, où, la température étant plus basse, il est nécessaire d'abaisser la pression à 180 mm Hg, pour une dernière formation de vapeur ; celle-ci se mélange dans la pompe à vide (6) à l'eau de rivière en se diluant 58 fois. Une colonne barométrique (5) permet l'équilibre entre les vapeurs sortant des deuxième et troisième corps.

3. *Échantillons prélevés à l'usine A.*

Dans les deux cas A_1 (pommes douces d'acidité totale inférieure à 60 méq/l ensilées depuis 1-4 jours) et A_2 (pommes aigres, d'acidité totale supérieure à 60 méq./l, et même période d'ensilage), les prélèvements ont été échelonnés sur deux heures, ce qui correspondait à un passage de 140 hl de jus ;

— moût : prélevé dans un bac en cours de remplissage (le niveau varie entre 60-150 hl) provenant directement des presses, tous les quarts d'heure ;
— jus : additionné d'enzyme de dépectinisation, tous les quarts d'heure ;
— concentré d'arôme : tous les quarts d'heure à l'entrée du bac tampon ;
— petites eaux : tous les quarts d'heure à la sortie de la colonne ;
— les échantillons du concentré et des eaux des deuxième et troisième corps de l'évaporateur ont été prélevés en une seule fois 18 heures après, au moment où les jus utilisés ont été concentrés ;
— l'échantillon « lavage de gaz » a été prélevé en totalité : 125 ml en 24 heures.

b) *Usine B*

Cette usine traitait des pommes aigres (acidité totale supérieure à 80 méq./l), ensilées 1 à 4 jours. L'usine utilise, pour la récupération d'arôme, un appareil Unipectine et, pour la concentration du jus désaromatisé, un appareil à triple effet à faisceaux tubulaires horizontaux.

Récupération d'arôme (fig. 7).

Le moût (*a*) est chauffé à contre-courant par le jus désaromatisé (*b*) sortant du séparateur de vapeur (4). Il entre dans un évaporateur horizontal (3) où il est chauffé par la vapeur (*g*). La fraction volatile du jus (10 p. 100 du moût initial) est rectifiée dans une colonne à anneaux de Raschig (7) chauffée en bas par la vapeur. Les températures en haut et en bas de la colonne sont de 98°C et 100°C (les anneaux de Raschig sont aspergés par l'arôme déjà condensé). Les eaux recueillies en bas de la colonne constituent les petites eaux (*e*). La partie volatile passe dans le condenseur (9) refroidi par eau industrielle (*i*). La fraction condensée (*c*) est partagée par un rotamètre : 1/10 passe dans le bac d'arôme et les 9/10 restant retournent en haut de la colonne pour la rectification. Les gaz non condensés (N_2, O_2, etc.) (*f*) qui entraînent des substances aromatiques sont lavés dans une colonne (15) par de l'eau glacée (*j*) et la fraction condensée est ajoutée au concentré d'arôme (*c*), les gaz s'échappant par le haut. Un litre d'arôme concentré provient de 130-150 litres de moût. Le jus désaromatisé sort de l'échangeur de chaleur à 42°C.

2. *Concentration du jus* (fig. 6).

Le concentrateur du jus désaromatisé et dépectinisé est le même que celui utilisé dans l'usine A.

3. *Échantillons prélevés à l'usine B.*

Le prélèvement des échantillons a été fait aux endroits suivants :

— moût : prélevé en trois fois dans un bac alimenté directement de la presse ;
— jus : dans la cuve à la sortie de l'échangeur de chaleur après agitation (en une seule fois) ;
— concentré d'arôme : à l'entrée du bac ;
— petites eaux : en bas de la colonne à fractionner en cinq fois, toutes les demi-heures (on a pu remarquer lors du prélèvement que ces eaux étaient inodores, et qu'elles ne sentaient pas la pomme comme dans l'usine A) ;
— jus concentré : prélevé en une seule fois pendant la concentration du jus désaromatisé ;
— eaux de l'évaporateur : en une seule fois, à l'entrée du troisième corps : elles représentent les vapeurs condensées venant des premier et deuxième corps ;
— eaux à la sortie de la pompe à vide, contenant les vapeurs évaporées au troisième corps, mais fortement diluées par l'eau de fonctionnement de la pompe (eau de rivière).

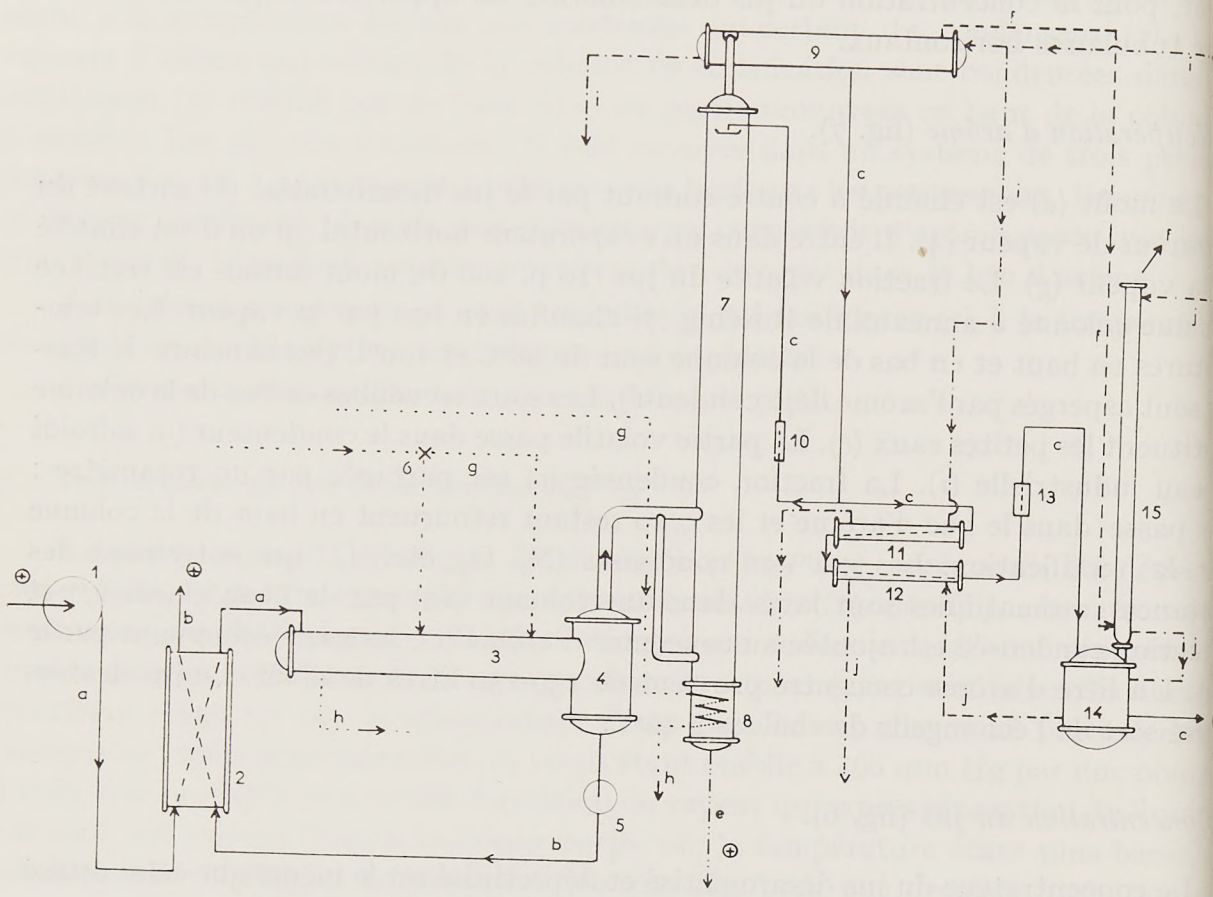


FIG. 7. — *Schéma de l'installation de récupération d'arôme de « B »* (Système Unipectine)

1. Pompe à moût
2. Échangeur de chaleur
3. Évaporateur
4. Séparateur de vapeur
5. Pompe à jus chaud
6. Régulateur de vapeur
7. Colonne à rectifier
8. Serpentin de chauffage
9. Condenseur
10. Débimètre à reflux
11. Refroidisseur à eau
12. Refroidisseur à eau glacée
13. Débimètre des arômes
14. Cuve tampon de récupération du concentré d'arôme
15. Colonne de lavage des gaz non condensables

a) Moût
b) Jus désaromatisé
c) Concentré d'arôme
d) Arôme récupéré au lavage des gaz non condensables
e) Petites eaux
f) Gaz non condensables
g) Vapeur vive
h) Sortie vapeur
i) Eau froide
j) Eau glacée

⊕ Prélèvement échantillon

c) *Usine C*

La matière première de cette usine est constituée par 2/3 de pommes aigres et /3 de pommes douces. Les pommes avaient été conservées en silos de 1 à 10 jours.

L'usine utilise un appareil Wiegand pour la récupération des arômes, et un ppareil à triple effet Wiegand plus un concentrateur rapide Luwa pour la concentration du jus désaromatisé. Les appareils sont en acier inoxydable.

. *Récupération d'arôme* (fig. 8).

Le schéma général est le suivant : le moût (*a*) sortant des presses, à une température de 10°C, passe dans un échangeur de chaleur (1), à contre-courant du jus désaromatisé (*b*) qui sort de l'évaporateur à 90°C. Le moût entre à 60°C environ dans 'évaporateur (2) : les vapeurs (10 p. 100 du moût initial) qui se forment, renfermant es substances d'arôme, sont séparées du liquide qu'elles entraînent et passent dans a colonne de rectification à anneaux de Raschig (6). Les petites eaux (*e*) sont parriellement éliminées et partiellement refroidies par eau glacée en vue du lavage des gaz non condensés dans une petite colonne (8). Les arômes sont obtenus en haut de a colonne de rectification. Ce système ne présente pas de condenseur séparé, mais comporte en haut de la colonne un serpentin à eau glacée (5) qui provoque la condensation des arômes. Les gaz non condensés (*f*), entraînant une partie des arômes, passent dans la colonne de lavage.

Un litre de concentré d'arôme provient de 200 litres de moût. Le jus désaromatisé (*b*) sort de l'échangeur de chaleur à 50°C et passe dans une cuve de 200 hl (*q*) où l'on ajoute la pectolase ; la durée de dépectinisation est de 2 à 3 heures, après quoi le jus est refroidi (10) dans un échangeur par de l'eau froide (*i*) et passe dans une autre cuve (11) où il est additionné de gélatine en poudre. Le collage se fait pendant 6 à 8 heures. Le jus du haut de la cuve est décanté et filtré sur un filtre à masse (13), tandis que le jus du fond est soumis avant filtration à une centrifugation (12). Les deux fractions réunies sont filtrées à nouveau sur filtre à masse (13) et à plaques (15) et passent dans le concentrateur.

2. *Concentration du jus désaromatisé* (fig. 9).

Le jus passe dans un premier échangeur de chaleur (2) d'où il sort à 40°C, puis dans un deuxième (3) où il est chauffé par de la vapeur vive à la température de 90°C. Dans le premier corps de l'évaporateur (4) le jus est chauffé par de la vapeur vive (*g*) et par la vapeur (*e*) qui sort du deuxième corps, enrichie et portée à la pression du premier par de la vapeur vive à travers un tube de « Venturi ». Le jus (*c*) passe dans le deuxième corps (5). Les vapeurs formées dans le premier (*d*) sont à 95°C et rentrent dans le deuxième. Il en est de même dans le deuxième corps : le jus est chauffé à 93°C par la vapeur sortant du premier corps (*d*) et par la vapeur, enrichie de vapeur vive, provenant du troisième corps (*e* + *g*). Dans ce dernier corps la température est de 64°C et les vapeurs qui se forment (*d*) sont condensées dans un condenseur barométrique (10) avec de l'eau de rivière (*i*). L'eau qui se condense à partir de la vapeur vive (*f*) passe du premier au deuxième corps et de celui-ci au troisième, puis est évacuée. Le jus sortant du troisième corps est concentré encore dans un évaporateur rapide Luwa (8) où il est chauffé à 115-125°C.

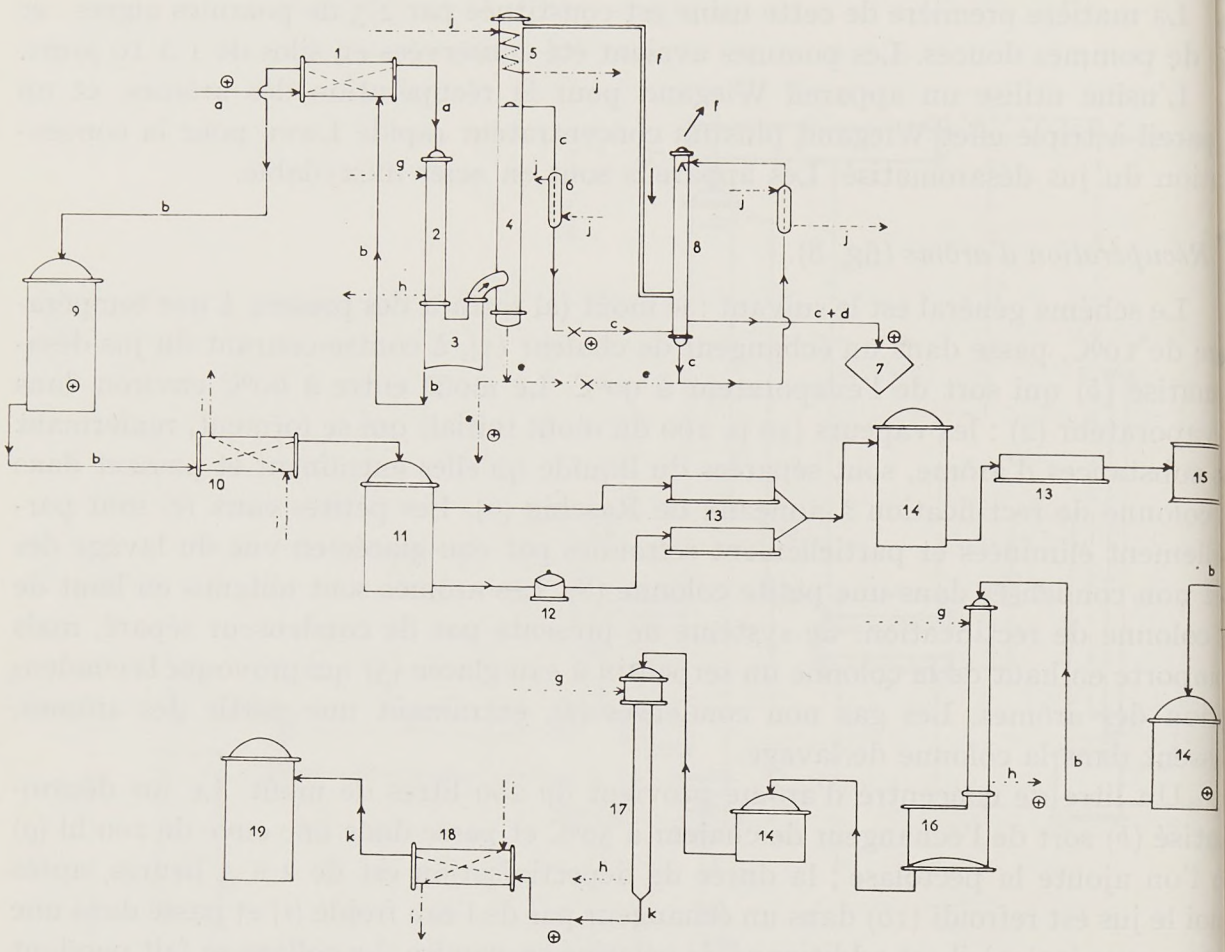


FIG. 8. — *Schéma de l'installation de récupération d'arôme et de concentration du jus de « C »*

(Système Wiegand)

1. Échangeur de chaleur
2. Évaporateur
3. Séparateur de vapeur
4. Colonne à rectifier
5. Condenseur
6. Refroidisseur à eau glacée
7. Cuve tampon de récupération du concentré d'arôme
8. Colonne de lavage des gaz non condensables
9. Cuve de dépectinisation
10. Refroidisseur du jus
11. Cuve de collage
12. Centrifugeuse
13. Filtre à masse
14. Cuve tampon
15. Filtre à plaques
16. Évaporateur Wiegand à triple effet
17. Évaporateur rapide Luwa
18. Refroidisseur de concentré
19. Cuve de stockage

a) Moût
b) Jus désaromatisé
c) Concentré d'arôme
d) Arôme récupéré au lavage des gaz non condensables
e) Petites eaux
f) Gaz non condensables
g) Vapeur vive
h) Sortie vapeur
i) Eau froide
j) Eau glacée
k) Concentré de jus de pommes

⊕ Prélèvement échantillon

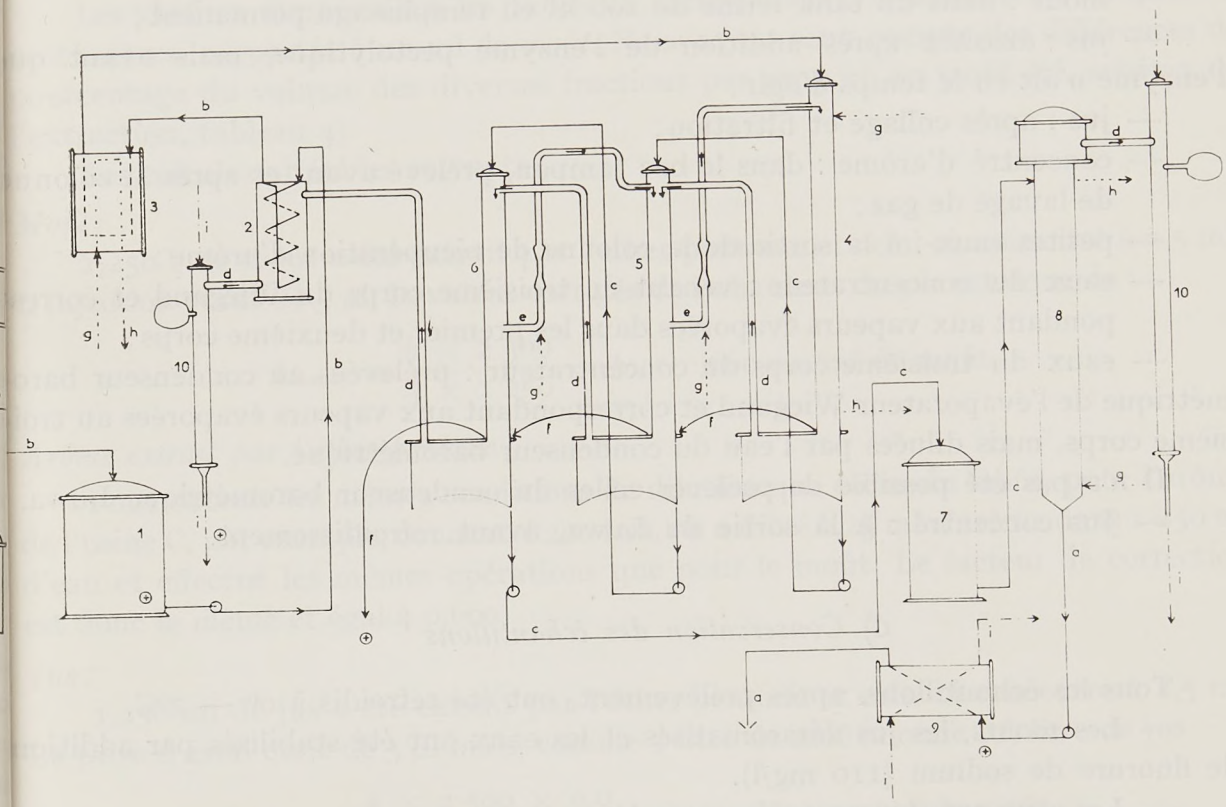


FIG. 9. — *Schéma de l'installation de concentration du jus de « C »* (Système Wiegand)

1. Cuve tampon, jus dépectinisé et collé
2. Échangeur de chaleur
3. Chauffage du jus
4. Premier corps de l'évaporateur Wiegand
5. Deuxième corps de l'évaporateur Wiegand
6. Troisième corps de l'évaporateur Wiegand
7. Cuve tampon pour le concentré
8. Évaporateur rapide Luwa
9. Refroidisseur du concentré
10. Condenseur barométrique

a) Concentré de jus de pommes
b) Jus dépectinisé, collé, filtré
c) Jus en cours de concentration
d) Vapeurs provenant de l'évaporation du jus
e) Vapeurs destinées à être comprimées
f) Vapeurs condensées
g) Vapeur vive
h) Sortie vapeur
i) Eau froide

⊕ Prélèvement échantillon

Les vapeurs qui se forment sont condensées dans un condenseur baro trique (10). Le jus concentré (*a*), refroidi dans un échangeur de chaleur (9), stocké.

3. *Échantillons prélevés dans l'usine C.*

Dans cette usine on a fait les prélèvements suivants :

— moût : dans un tank fermé de 100 hl en remplissage permanent ;

— jus : aussitôt après addition de l'enzyme pectolytique, mais avant l'enzyme n'ait eu le temps d'agir ;

— jus : après collage et filtration ;

— concentré d'arôme : dans le bac tampon, prélevé avant et après la colon de lavage de gaz ;

— petites eaux : à la sortie de la colonne de récupération d'arôme ;

— eaux du concentrateur : venant du troisième corps du Wiegand et corr pondant aux vapeurs évaporées dans les premier et deuxième corps ;

— eaux du troisième corps du concentrateur : prélevées au condenseur ba métrique de l'évaporateur Wiegand et correspondant aux vapeurs évaporées au tr sième corps, mais diluées par l'eau du condenseur barométrique.

Il n'a pas été possible de prélever celles du condenseur barométrique Luwa

— Jus concentré : à la sortie du Luwa, avant refroidissement.

d) *Conservation des échantillons*

Tous les échantillons, après prélèvement, ont été refroidis à 0° — 2°C.

— Les moûts, les jus désaromatisés et les eaux ont été stabilisés par additi de fluorure de sodium (110 mg/l).

— Les eaux ont été conservées congelées.

— Les échantillons de moût et de jus concentré ont été conservés en chamb froide à une température oscillant entre + 1° et + 5°C.

— Les arômes concentrés ont été conservés au réfrigérateur à une températu de + 5°C.

3. 3. Méthodes d'analyse et de calcul

L'analyse des différentes fractions prélevées au cours de la récupération d arômes n'a pu être faite par injection directe de l'atmosphère en équilibre, les sub tances d'arôme se trouvant à l'état trop dilué. Nous avons donc choisi d'effectu leur extraction par l'éther-pentane 2 : 1 (v/v) comme nous l'avons dit plus haut.

Nous avons effectué la comparaison, d'une part des différentes fractions ent elles en fonction de leur origine, d'autre part, des différents échantillons prélevés a cours de la concentration, afin de suivre la marche des divers appareils. Nous avon voulu comparer les résultats de l'analyse de l'arôme tel que nous l'obtenions à l sortie de l'appareil, c'est-à-dire en solution hydro-alcoolique, et également après un extraction à l'éther-pentane effectuée dans les mêmes conditions que les extractio du moût et du jus. Mais nous nous sommes aperçus que cette extraction était incom plète et que des pertes avaient lieu lors de l'évaporation du solvant, ce qui nous empêché d'établir le bilan de fonctionnement proprement dit des appareils (no

avons porté sur le tableau 11 un exemple de bilan). Nous considérons cependant que, puisque nous avons opéré dans des conditions identiques, la comparaison que nous effectuons entre les différents échantillons est valable, puisque nous ne cherchons pas à donner des résultats en valeur absolue.

Explication des calculs effectués

Les chiffres donnés dans les tableaux correspondent à la hauteur des pics en centimètres, rapportée à un ml de *moût*. Nous avons tenu compte des différences de pourcentage du volume des diverses fractions par rapport au moût (cf. schéma de l'extraction, tableau 4).

Les calculs ont été les suivants :

Moût :

1,250 l/ de moût a été extrait par l'éther-pentane, et celui-ci concentré à 2,5 ml. L'injection étant de 3 µl, la valeur corrigée de la hauteur du pic est donc de :

$$h_{corr.} = \frac{h \times 2\,500}{3 \times 1\,250} = h \times 0{,}660 \text{ cm/ml de moût}$$

Arôme extrait par l'éther-pentane :

Pour obtenir les mêmes conditions de dilution que celles du moût, pour l'arôme de l'usine C, par exemple, concentré 200 fois, on a dilué 6,25 ml d'arôme dans 1 250 ml d'eau et effectué les mêmes opérations que pour le moût. Le facteur de correction est donc le même et égal à 0,660.

Jus :

1,250 ml de jus a été extrait par l'éther-pentane et celui-ci concentré à 2,5 ml. La prise d'essai était de 3 µl mais, comme 1 litre de moût donne 0,9 litre de jus :

$$h_{corr.} = \frac{h \times 2\,500 \times 0{,}9}{3 \times 1\,250} = h \times 0{,}600 \text{ cm/ml de moût}$$

Petites eaux :

1,250 → 2,5 ml ; prise d'essai de 3 µl.

$$h_{corr.} = h \times 0{,}66 \text{ cm/ml d'eau}$$

Exemple de l'usine C :

1 litre de moût donne 0,005 litre d'arôme
0,095 litre de petites eaux

d'où

$$h_{corr.} = h \times 0{,}66 \times 0{,}095 = h \times 0{,}063 \text{ cm/ml de moût}$$

de même pour l'usine A :

$$h_{corr.} = h \times 0{,}062$$

pour l'usine B :

$$h_{corr.} = h \times 0{,}061$$

Concentré :

250 ml → 2,5 ml, prise d'essai 3 µl

comme 1 litre de moût donne 0,125 litre de concentré :

$$h_{corr.} = \frac{h \times 2\,500 \times 0{,}125}{3 \times 250} = h \times 0{,}415 \text{ cm/ml de moût}$$

Eaux de contentration des premier et deuxième corps.

1,250 l → 2,5 ml ; prise d'essai de 3 µl

Un litre de jus donne 0,258 litre d'eau dans le premier corps et 0,516 dans somme des deux premiers corps.

d'où

$h_{corr.} = 0{,}66 \times 0{,}258 = h \times 0{,}172$ pour le premier corps

$h_{corr.} = 0{,}66 \times 0{,}516 = h \times 0{,}344$ pour la somme des deux premiers corps

Eaux de condensation du troisième corps.

Les eaux se trouvant très fortement diluées à la sortie, par l'eau de rivière alimentant la pompe à vide ou le condenseur barométrique, on ne peut évaluer la valeur des pics sans risquer de grosses erreurs.

3. 4. Composition et comparaison des différentes fractions en fonction de leur origine

Nous avons porté sur les tableaux 5 à 9, les valeurs obtenues pour les différentes fractions. Ces valeurs obtenues dans les trois usines nous ont permis de tirer les conclusions suivantes.

1. *Moût* (tabl. 5) (exemple de chromatogramme, fig. 10)

On constate que, dans le cas des arômes, la composition des substances volatiles du moût est très voisine. Il existe certaines différences d'ordre quantitatif, en particulier le moût à l'usine C apparaît nettement moins riche que celui des usines A et B.

Les constituants sont les mêmes que ceux des arômes : les alcools sont également prédominants. Il existe cependant une différence importante : le moût ne renferme ni hexanal, ni hexénal. Or, si ces substances se forment selon l'opinion de M. Gottauf R. Duden (1965) et F. Drawert et *al.* (1965) au moment du pressage des pommes et atteignent leur teneur maximale après quelques minutes de contact avec les parties solides de la pomme, on devrait les mettre en évidence dans les moûts comme dans les concentrés d'arôme. Le chauffage a donc certainement une influence sur leur formation.

Les esters les plus représentés sont l'acétate d'éthyle, le butyrate d'éthyle et dans le cas de A_2, l'acétate de butyle.

2. *Jus désaromatisé* (tabl. 6) (exemple de chromatogramme, fig. 11)

Il reste, dans le jus après extraction, une teneur appréciable de toutes les substances volatiles ; la désaromatisation est loin d'être complète. On y retrouve tous les alcools présents dans le moût ; les esters légers semblent avoir été mieux extraits. (En revanche il apparaît parfois quelques substances nouvelles, dont les pics sortent entre le butanol et le pentanol). Les échantillons ne renferment plus d'hexanal et ne montrent que des traces d'hexénal. On ne peut vérifier la disparition des constituants les plus volatils (en particulier les aldéhydes sortant de la colonne avant l'acétate d'éthyle) auxquels se superpose le résidu du solvant. D'autre part, l'élimination complète de celui-ci entrainerait de toutes manières des pertes très importantes de toutes les substances, comme nous avons pu le constater.

3. *Concentré d'arôme* (tabl. 7) (exemple de chromatogramme, fig. 12)

Nous nous baserons sur les résultats de l'analyse directe des arômes, exposés en détail dans la première partie de ce travail. Comme on peut le voir d'après le tableau 10 donné comme exemple (dans lequel nous avons porté les valeurs exprimées en cm/ml de moût), les résultats quantitatifs obtenus par l'extraction à l'éther-pentane ne sont en rien comparables à ceux que l'on obtient par l'analyse directe, particulièrement en ce qui concerne les alcools les plus légers. Ceci met en relief l'insuffisance de la méthode par extraction aux solvants qu'il était cependant indispensable d'effectuer pour obtenir des valeurs comparables nécessaires à notre bilan.

D'après l'étude des chromatogrammes obtenus avec les arômes liquides non extraits, on voit que la composition des arômes est à peu près la même dans tous les cas.

Quantitativement, les arômes de l'usine A sont les plus riches, puis viennent ceux des usines C et B. Ceci est normal car c'est dans l'usine B que la concentration est la moins poussée (140 fois). Il n'apparaît pas de différences très nettes entre l'arôme des pommes douces (A_1) et aigres (A_2), si ce n'est que les premières sont légèrement plus riches en alcools que les deuxièmes, et moins riches en esters.

Les arômes renferment des quantités appréciables d'aldéhydes en C_6 : hexanal et surtout hexénal en quantité à peu près équivalente dans tous les échantillons.

4. *Petites eaux* (tabl. 8) (exemple de chromatogramme, fig. 13)

Les pertes en substances volatiles dans les petites eaux sont faibles. La teneur de ces dernières en produits volatils est presque nulle dans les usines B et C. Les pertes sont relativement supérieures dans l'usine A, où l'on retrouve de petites quantités de tous les alcools et des esters les plus importants, tels que les acétates d'éthyle, de butyle, d'*iso*-butyle et le butyrate d'éthyle. Dans l'ensemble, les pertes dans cette fraction sont négligeables à côté de celles qui ont lieu dans le jus.

5. *Eaux du concentrateur* (tabl. 9) (exemple de chromatogramme, fig. 14)

Ce sont les échantillons dans lesquels on doit normalement retrouver les substances volatiles restées dans le jus. On retrouve effectivement dans la fraction correspondant aux premier et deuxième corps des quantités non négligeables de presque tous les constituants qui étaient présents en quantité appréciable dans le jus ; la fraction correspondant au troisième corps ne contient plus rien.

6. *Jus concentré* (exemple de chromatogramme, fig. 16)

Il ne reste aucune trace de produits volatils dans les concentrés des usines B et C ; dans l'usine A on retrouve quelques traces de produits qui ne sont pas identifiables.

TABLEAU 5

Analyse des constituants volatils des moûts

Analyse des extraits éther-pentane

	A_1	A_2	B	C
Éthanal	—	—	—	—
Propanal	—	—	—	—
Iso-butanal	2,2	—	—	—
Acétone				
Butanal	2,3	—	—	—
Acétate de méthyle				
Acétate d'éthyle	23,5	48,1	31,7	5,9
Acétate d'*iso*-propyle	18,2	3,7	3,6	8,0
Méthanol				
Éthanol	27,4	10,1	7,5	8,4
Propionate d'éthyle				
Butyrate de méthyle	1,6	2,1	1,7	0,3
Acétate de propyle				
Pic non identifié	0,3	2,4	1,7	0
Acétate d'*iso*-butyle	0,2	0,3	0	traces
Butyrate d'éthyle	6,9	5,4	2,7	1,5
Propanol	7,8	7,3	5,5	1,3
Acétate de butyle	0,3	3,4	0,6	0,9
Hexanal	0	0	0	0
Iso-butanol	15,4	10,8	7,9	5,2
Acétate d'*iso*-amyle	2,8	2,4	0,9	0,7
Butanol	42,9	33,2	23,4	20,6
Valérianate d'éthyle	0	0,3	0,3	0
Propionate d'amyle	0,2	0	traces	0
Iso-pentanol	97,3	47,3	44,7	28,5
Valérianate de propyle				
Caproate d'éthyle				
Butyrate de butyle				
Hexénal	0	0	0	0
Pentanol	2,3	1,1	1,1	0,9
Acétate d'hexyle	1,0	0,5	0,6	0,4
Pic non identifié	1,2	0,9	0,5	0,4
Propionate d'hexyle	0,3	0,2	0,1	0,1
Hexanol	43,1	27,2	28,7	23,5
Hexénol	0,4	0,4	0,9	0,5
Caproate de butyle	0,3	0,5	1,3	0,5
Pic non identifié	0,4	traces	0	1,2

TABLEAU 6

Analyse des constituants volatils des jus désaromatisés
Analyse des extraits éther-pentane

	A_1	A_2	B	C	
				av. enz.	ap. enz.
Éthanal	—	—	—	—	—
Propanal	—	—	—	—	—
Iso-butanal	—	—	—	—	—
Acétone					
Butanal	7,2	—	16,0	—	—
Acétate de méthyle					
Acétate d'éthyle	8,0	5,6	10,4	9,2	12,7
Acétate d'*iso*-propyle	3,7	1,5	5,0	6,6	4,9
Méthanol					
Éthanol	46,4	10,2	2,3	4,6	6,5
Propionate d'éthyle					
Butyrate de méthyle	0	0,5	0,6	0,2	0,9
Acétate de propyle					
Pic non identifié	1,8	0,4	6,0	0,2	0,4
Acétate d'*iso*-butyle	0	0	0	0	0
Butyrate d'éthyle	2,3	0,2	2,6	0,4	0,3
Propanol	5,8	2,3	7,5	2,3	2,3
Acétate de butyle	0,3	0,2	0	0,3	0,2
Hexanal	0	0	0	0	0
Iso-butanol	5,5	3,1	1,4	3,9	4,1
Acétate d'*iso*-amyle	0,5	0,1	0	0,2	0,2
Butanol	10,4	7,1	5,9	16,8	15,2
Valérianate d'éthyle	0,6	traces	1,0	traces	0
Propionate d'amyle	0,2	0	0,4	0	traces
Iso-pentanol					
Valérianate de propyle	45,0	22,3	5,7	18,2	16,0
Caproate d'éthyle					
Butyrate de butyle					
Hexénal	*traces	*traces	*traces	*traces	*traces
Pentanol	0,6	0,2	0,2	0,5	0,5
Acétate d'hexyle	0,4	traces	traces	traces	traces
Pic non identifié	1,0	0,7	0,4	0,5	0,5
Propionate d'hexyle	0	0	0,1	traces	traces
Hexanol	5,0	3,6	2,4	8,6	8,2
Hexénol	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2
Caproate de butyle	0,1	traces	1,0	2,2	1,2
Pic non identifié	0,3	0	0	0,7	0,7

TABLEAU 7

Analyse des constituants volatils des concentrés d'arômes dilués

Analyse des extraits éther-pentane

	A_1	A_2	B	C
Éthanal	—	—	—	—
Propanal	—	—	—	—
Iso-butanal	—	—	—	—
Acétone				
Butanal	11,7	traces	9,2	2,2
Acétate de méthyle				
Acétate d'éthyle	30,3	46,0	14,8	28,2
Acétate d'*iso*-propyle	0,4	0	0,6	0,8
Méthanol				
Éthanol	2,4	4,0	2,1	2,0
Propionate d'éthyle				
Butyrate de méthyle	0,6	1,3	0,3	0,6
Acétate de propyle				
Pic non identifié	0	0	0	0
Acétate d'*iso*-butyle	0,1	0,3	traces	traces
Butyrate d'éthyle	3,0	4,0	2,4	3,0
Propanol	2,1	2,8	1,1	1,3
Acétate de butyle	2,2	2,9	0,4	1,3
Hexanal	1,1	—	0,6	0,9
Iso-butanol	4,3	6,5	3,3	3,3
Acétate d'*iso*-amyle	1,6	2,3	0,5	1,1
Butanol	11,7	12,9	8,9	9,1
Valérianate d'éthyle	—	—	—	—
Propionate d'amyle	0	traces	0	0
Iso-pentanol				
Valérianate de propyle	20,5	26,1	17,4	16,2
Caproate d'éthyle				
Butyrate de butyle				
Hexénal	7,9	11,6	7,4	5,7
Pentanol	0,6	1,5	0,5	0,6
Acétate d'hexyle	0,7	0,9	0,3	0,6
Pic non identifié	0,1	0,2	traces	traces
Propionate d'hexyle	0,1	0,2	traces	traces
Hexanol	7,9	11,7	6,9	7,5
Hexénol	0,1	0,3	0,3	0,2
Caproate de butyle	0,9	1,5	0,8	0,6
Pic non identifié	0	0	0	0

TABLEAU 8

Analyse des constituants volatils des petites eaux
Analyse des extraits éther-pentane

	A_1	A_2	B	C
Éthanal	—	—	—	—
Propanal	—	—	—	—
Iso-butanal	—	—	—	—
Acétone				
Butanal	1,5	1,6	0,2	—
Acétate de méthyle				
Acétate d'éthyle	2,2	3,1	1,5	0,8
Acétate d'*iso*-propyle	3,8	0,1	traces	traces
Méthanol				
Éthanol	0,7	0,7	0,1	0,1
Propionate d'éthyle				
Butyrate de méthyle	traces	traces	traces	traces
Acétate de propyle				
Pic non identifié	0,2	traces	traces	traces
Acétate d'*iso*-butyle	0,9	traces	0	0
Butyrate d'éthyle	0,1	0,2	traces	traces
Propanol	0,2	0,2	traces	0,1
Acétate de butyle	traces	traces	0	0
Hexanal	traces	—	0	0
Iso-butanol	0,3	0,3	traces	0,2
Acétate d'*iso*-amyle	traces	traces	0	traces
Butanol	1,0	1,2	0,3	1,0
Valérianate d'éthyle	traces	0	0	0
Propionate d'amyle	0	0	0	0
Iso-pentanol				
Valérianate de propyle	1,1	1,5	0,4	1,1
Caproate d'éthyle				
Butyrate de butyle				
Hexénal	traces	traces	traces	traces
Pentanol	traces	traces	traces	traces
Acétate d'hexyle	traces	traces	0	traces
Pic non identifié	traces	traces	traces	traces
Propionate d'hexyle	traces	traces	0	traces
Hexanol	0,6	0,7	0,1	0,7
Hexénol	traces	traces	traces	traces
Caproate de butyle	traces	0,2	traces	0,2
Pic non identifié	0	0	traces	0

TABLEAU 9

Analyse des constituants volatils des vapeurs évaporées dans les 1er et 2e corps et condensés dans le 3e corps

Analyse des extraits éther-pentane

	A_1	A_2	B	C
Éthanal	—	—	—	—
Propanal	—	—	—	—
Iso-butanal	—	—	—	—
Acétone				
Butanal	2,8	13,8	14,0	0,4
Acétate de méthyle				
Acétate d'éthyle	8,2	4,6	8,2	3,8
Acétate d'*iso*-propyle	0,3	2,4	2,7	0,1
Méthanol				
Éthanol	1,2	2,3	2,5	traces
Propionate d'éthyle				
Butyrate de méthyle	0,1	0,1	0,1	traces
Acétate de propyle				
Pic non identifié	traces	0,1	0,1	0
Acétate d'*iso*-butyle	0	0	0	0
Butyrate d'éthyle	0,2	0,8	0,8	traces
Propanol	0,6	0,6	0,4	0,2
Acétate de butyle	0	0	0,1	0
Hexanal	0	0	0	0
Iso-butanol	1,1	1,0	0,7	0,7
Acétate d'*iso*-amyle	traces	traces	traces	traces
Butanol	2,2	3,5	2,0	2,3
Valérianate d'éthyle	0	0	0	0
Propionate d'amyle	traces	0	traces	traces
Iso-pentanol	3,2	4,3	3,5	4,3
Valérianate de propyle				
Caproate d'éthyle				
Butyrate de butyle				
Hexénal	0	0	0	0
Pentanol	0,1	0,1	0,1	0,2
Acétate d'hexyle	traces	traces	traces	0
Pic non identifié	0,1	0,2	0,2	traces
Propionate d'hexyle	0	traces	traces	0
Hexanol	0,7	1,4	0,8	3,6
Hexénol	traces	traces	0,1	0,1
Caproate de butyle	0,3	0,5	0,4	0,3
Pic non identifié	0	0	0	0

TABLEAU IO

Comparaison des méthodes d'analyse des constituants volatils

Exemple du concentré d'arôme A_2

	Injection		
	Échantillon liquide	Extrait éther-pentane	Vapeur en équilibre avec l'échantillon
Éthanal	190,0	—	+++
Propanal	1,6	—	+
Iso-butanal	1,5	traces	+
Acétone			
Butanal	3,4	traces	++
Acétate de méthyle			
Acétate d'éthyle	140,0	46,0	++++
Acétate d'*iso*-propyle	22,8	0	traces
Méthanol			
Éthanol	1 150,0	4,0	++++
Propionate d'éthyle			
Butyrate de méthyle	—	1,3	traces
Acétate de propyle			
Pic non identifié	—	0	—
Acétate d'*iso*-butyle	traces	0,3	+
Butyrate d'éthyle	6,1	4,0	+++
Propanol	23,5	2,8	+++
Acétate de butyle	4,0	2,9	+++
Hexanal	2,5	—	++
Iso-butanol	11,4	6,5	++
Acétate d'*iso*-amyle	4,0	2,3	+++
Butanol	38,9	12,9	++
Valérianate d'éthyle	traces	traces	—
Propionate d'amyle	0,2	traces	—
Iso-pentanol			
Valérianate de propyle	47,1	26,1	+++
Caproate d'éthyle			
Butyrate de butyle	10,2	11,6	+++
Hexénal	1,5	1,5	traces
Pentanol	0	0,9	++
Acétate d'hexyle	0,6	0,2	traces
Pic non identifié	traces	0,2	traces
Propionate d'hexyle	17,5	11,7	++
Hexanol	0,6	0,3	traces
Hexénol	2,5	1,5	+
Caproate de butyle	0	0	traces
Pic non identifié			

TABLEAU II

Analyse des constituants volatils des moûts et des différentes fractions obtenues industriellement pour A_2

	Moût	Arôme	Jus	Petites eaux	Arôme + Jus + P. eaux *	Conc.	Vapeurs 1er + 2e corps	Vapeurs 3e corps
Éthanal	—	—	—	—	—	Dans le chromatogramme du jus concentré on peut dire que l'on ne trouve que des traces sans intérêt, sauf pour un pic de 2,0 cm à la place du butyrate d'éthyle	—	Dans le chromatogramme des vapeurs du troisième corps du concentrateur on ne trouve que des traces de substances dont l'appréciation est difficile étant donné la dilution de ces vapeurs dans l'eau de fonctionnement du condenseur barométrique.
Propanal	—	—	—	—	—		—	
Iso-Butanal Acétone	—	traces	—	—	—		—	
Butanal Acétate de méthyle	—	traces	—	1,6	1,6		13,8	
Acétate d'éthyle	48,1	46,0	5,6	3,1	54,7		4,6	
Acétate d'*iso*-propyle Méthanol	3,7	0	1,5	0,1	1,6		2,4	
Éthanol Propionate d'éthyle	10,1	4,0	10,2	0,7	14,9		2,3	
Butyrate de méthyle Acétate de propyle	2,1	1,3	0,5	traces	1,8		0,1	
Pic non identifié	2,4	0	0,4	traces	0,4		0,1	
Acétate d'*iso*-butyle	0,3	0,3	0	traces	0,3		0	
Butyrate d'éthyle	5,4	4,0	0,2	0,2	4,4		0,8	
Propanol	7,3	2,8	2,3	0,2	5,3		0,6	
Acétate de butyle	3,4	2,9	0,2	traces	3,1		0	
Hexanal	0	—	0	—	...		0	
Iso-butanol	10,8	6,5	3,1	0,3	9,9		1,0	
Acétate d'*iso*-amyle	2,4	2,3	0,1	traces	2,4		traces	
Butanol	33,2	12,9	7,1	1,2	21,2			
Valérianate d'éthyle	0,3	—	traces	0	...		0	
Propionate d'amyle	0	traces	0	0	traces		0	
Iso-pentanol Valérianate de propyle Caproate d'éthyle Butyrate de butyle	47,3	26,1	22,3	1,5	49,9		4,3	
Hexénal	0	11,6	traces	traces	11,6		0	
Pentanol	1,1	1,51	0,2	traces	1,7		0,1	
Acétate d'hexyle	0,5	0,9	traces	traces	0,9		traces	
Pic non identifié	0,9	0,2	0,7	traces	0,9		0,2	
Propionate d'hexyle	0,2	0,2	0	traces	0,2		traces	
Hexanol	27,2	11,7	3,6	0,7	16,0		1,4	
Hexénol	0,4	0,3	0,1	traces	0,4		traces	
Caproate de butyle	0,5	1,5	traces	0,2	1,7		0,5	
Pic non identifié	traces	0	0	0	0		0	

* Théoriquement = moût.

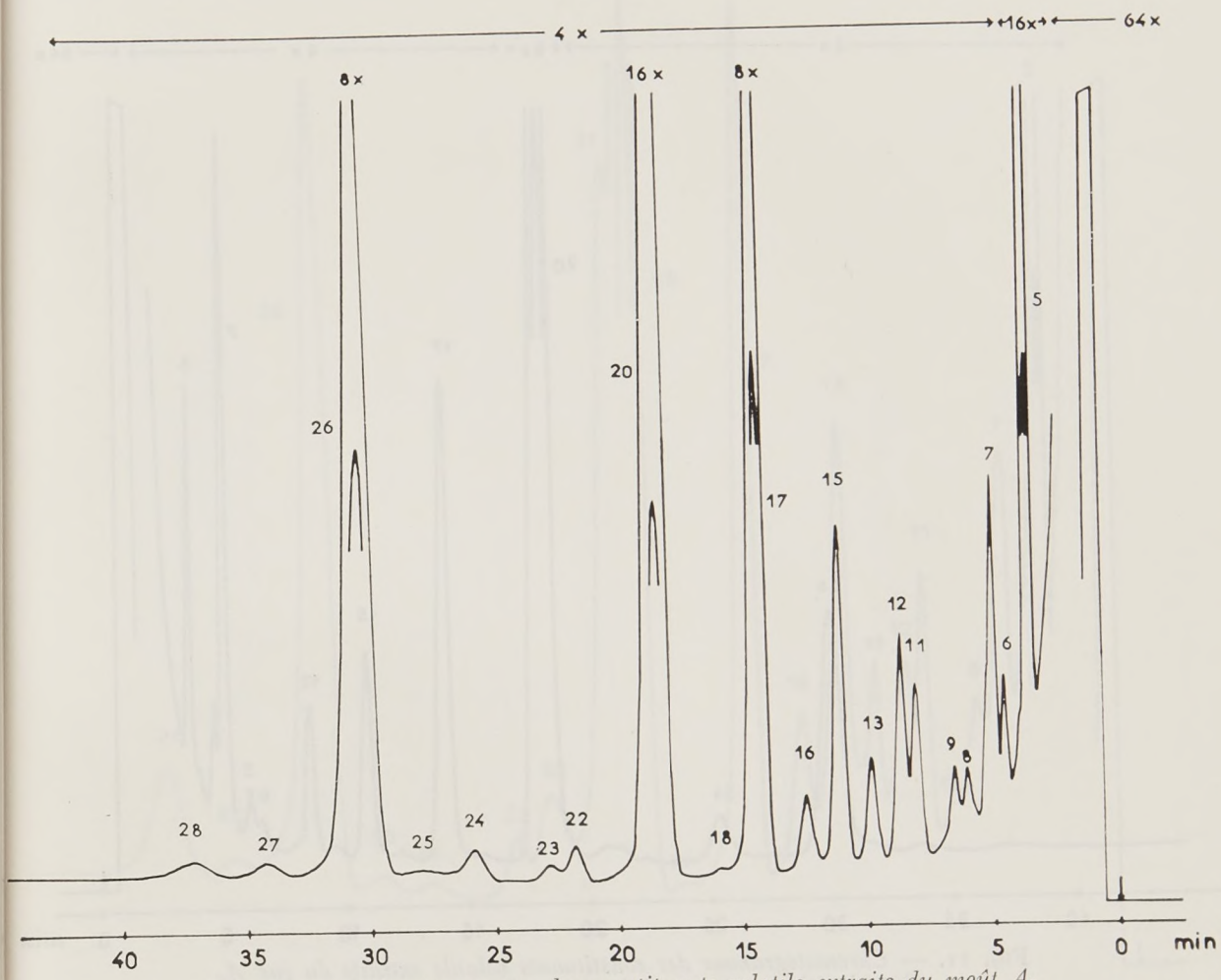


FIG. 10. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits du moût A_2*
Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

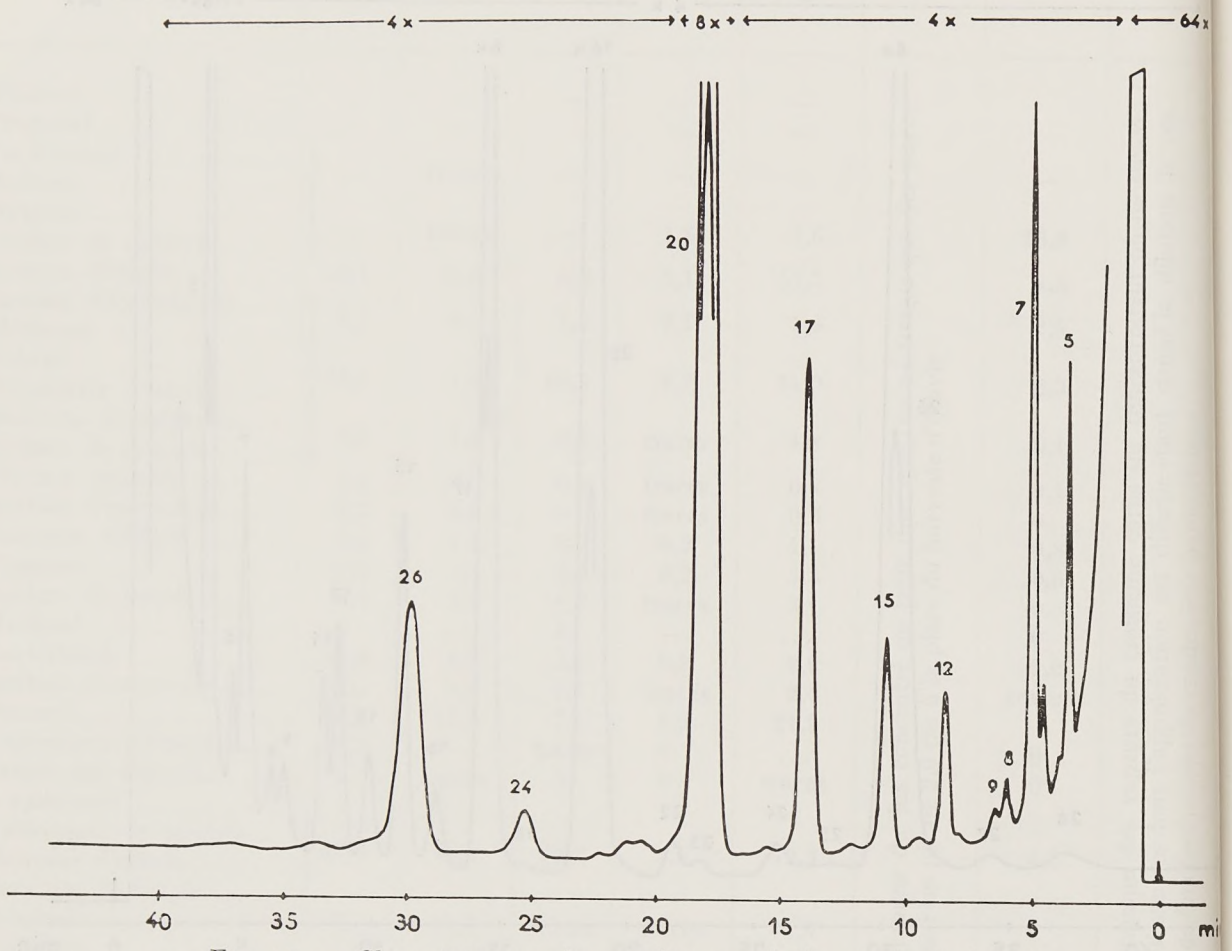


FIG. 11. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits du jus A_2*
Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

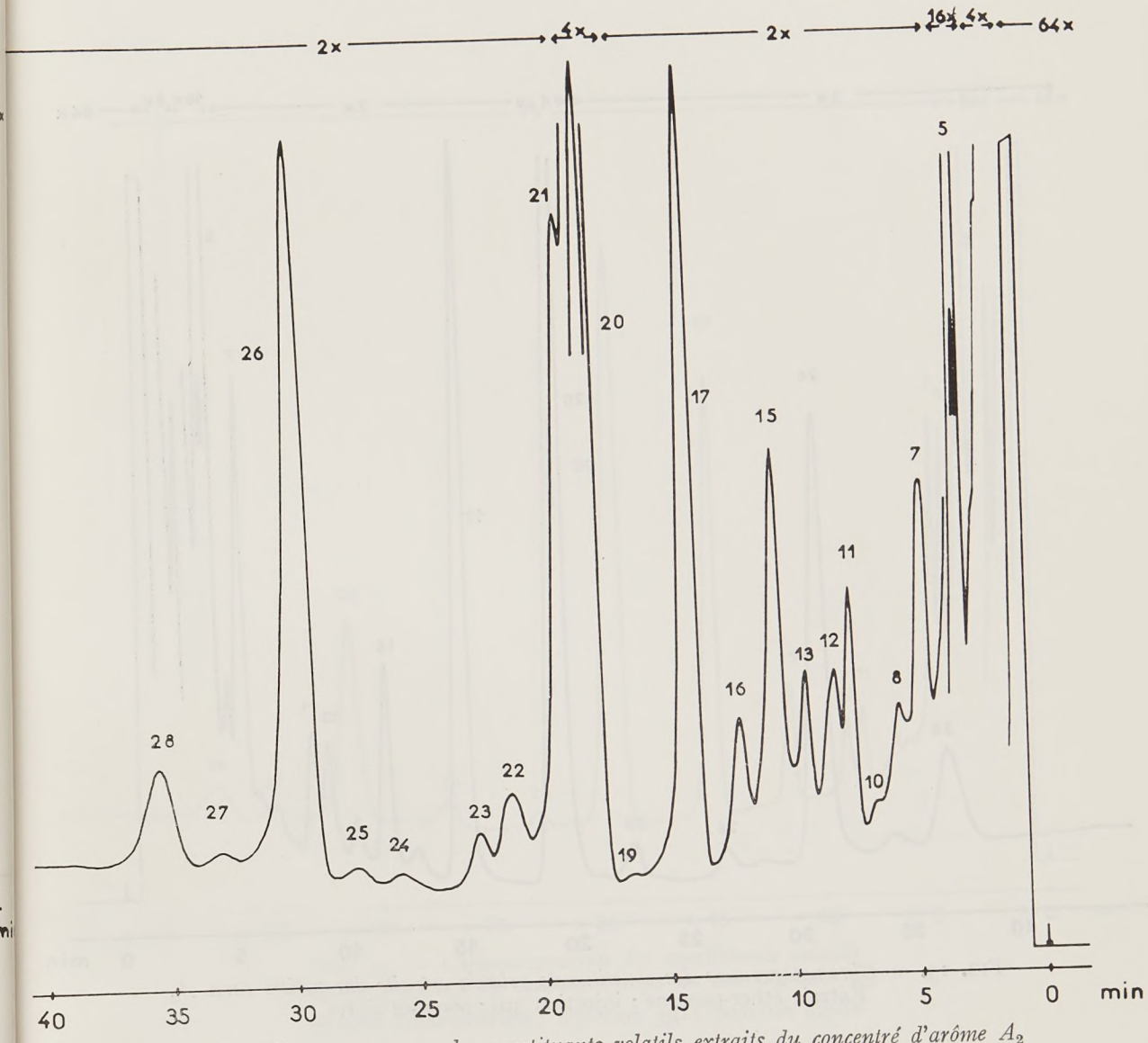


FIG. 12. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits du concentré d'arôme* A_2
Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

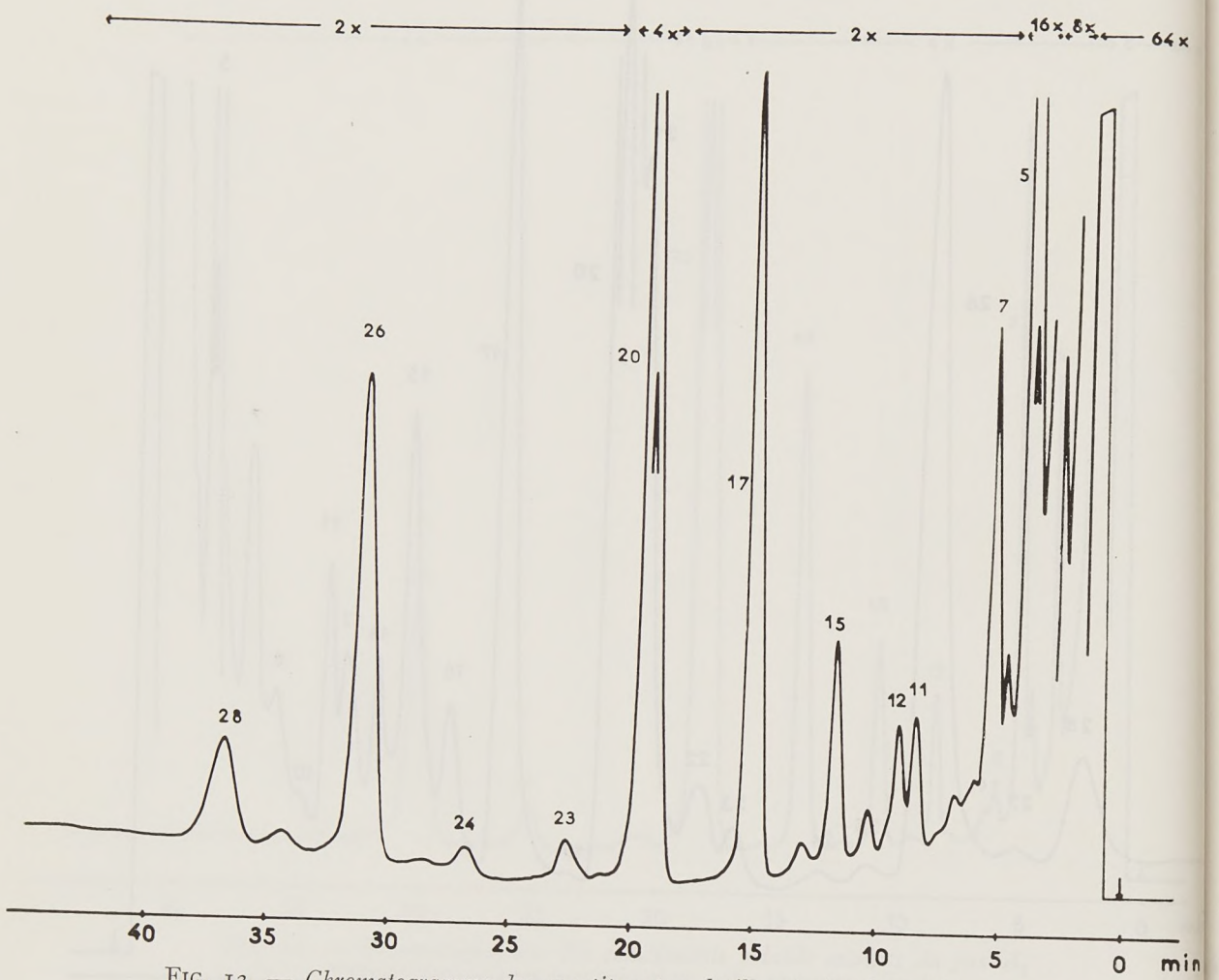


FIG. 13. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits des petites eaux A_2*
Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

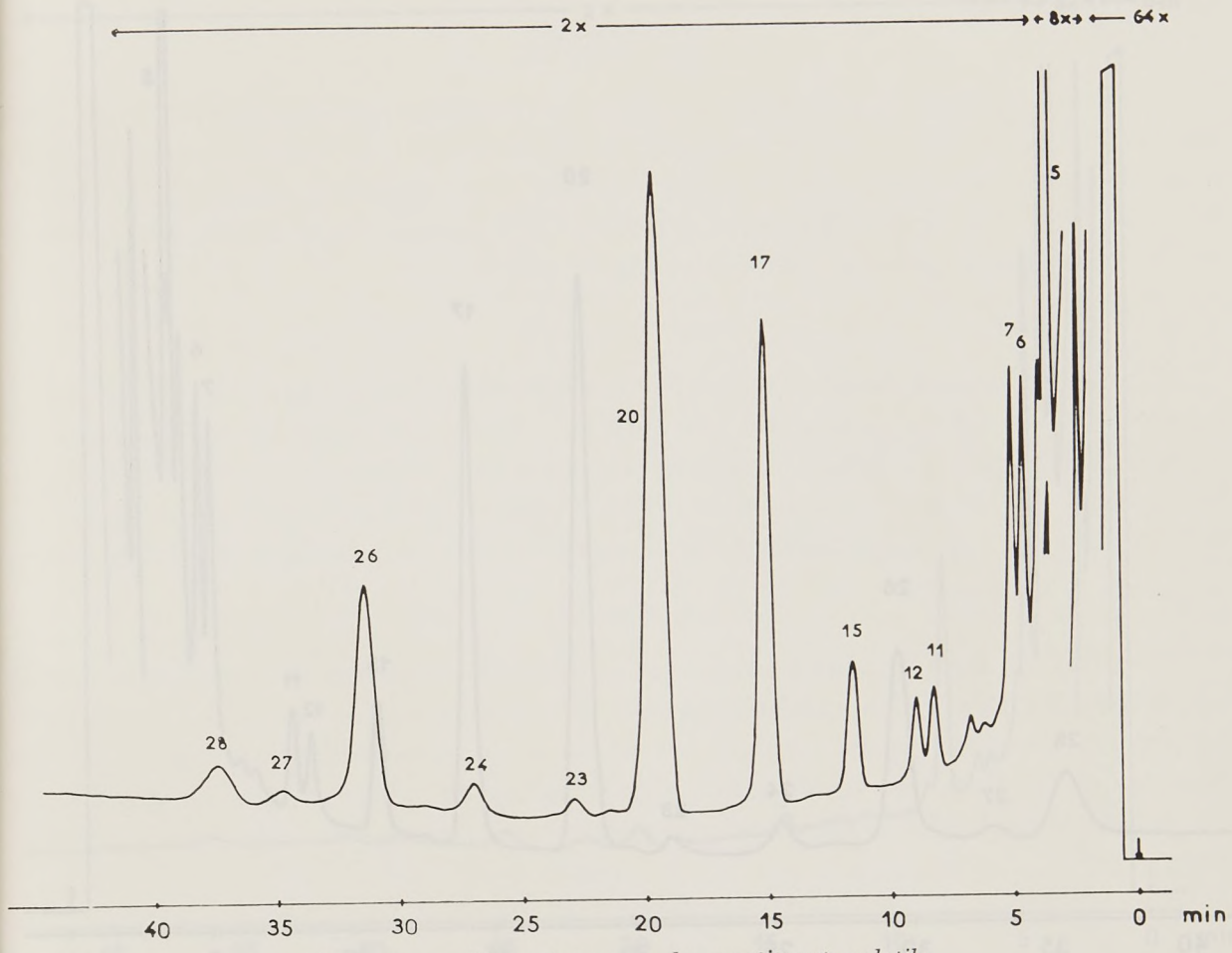


FIG. 14. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits des eaux du deuxième corps du concentrateur* A_2

Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

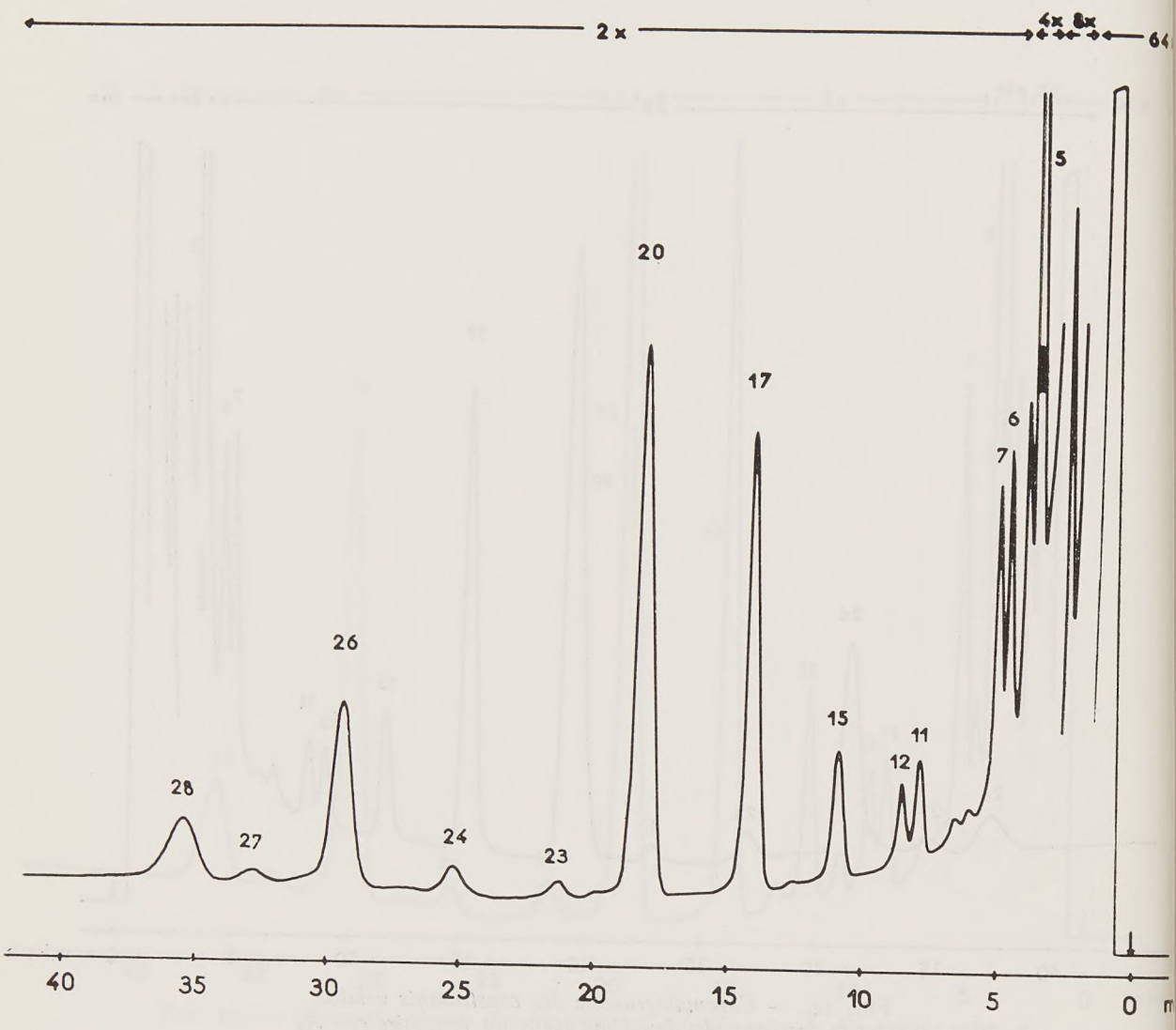


FIG. 15. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits des eaux du troisième corps du concentrateur* A_2
Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

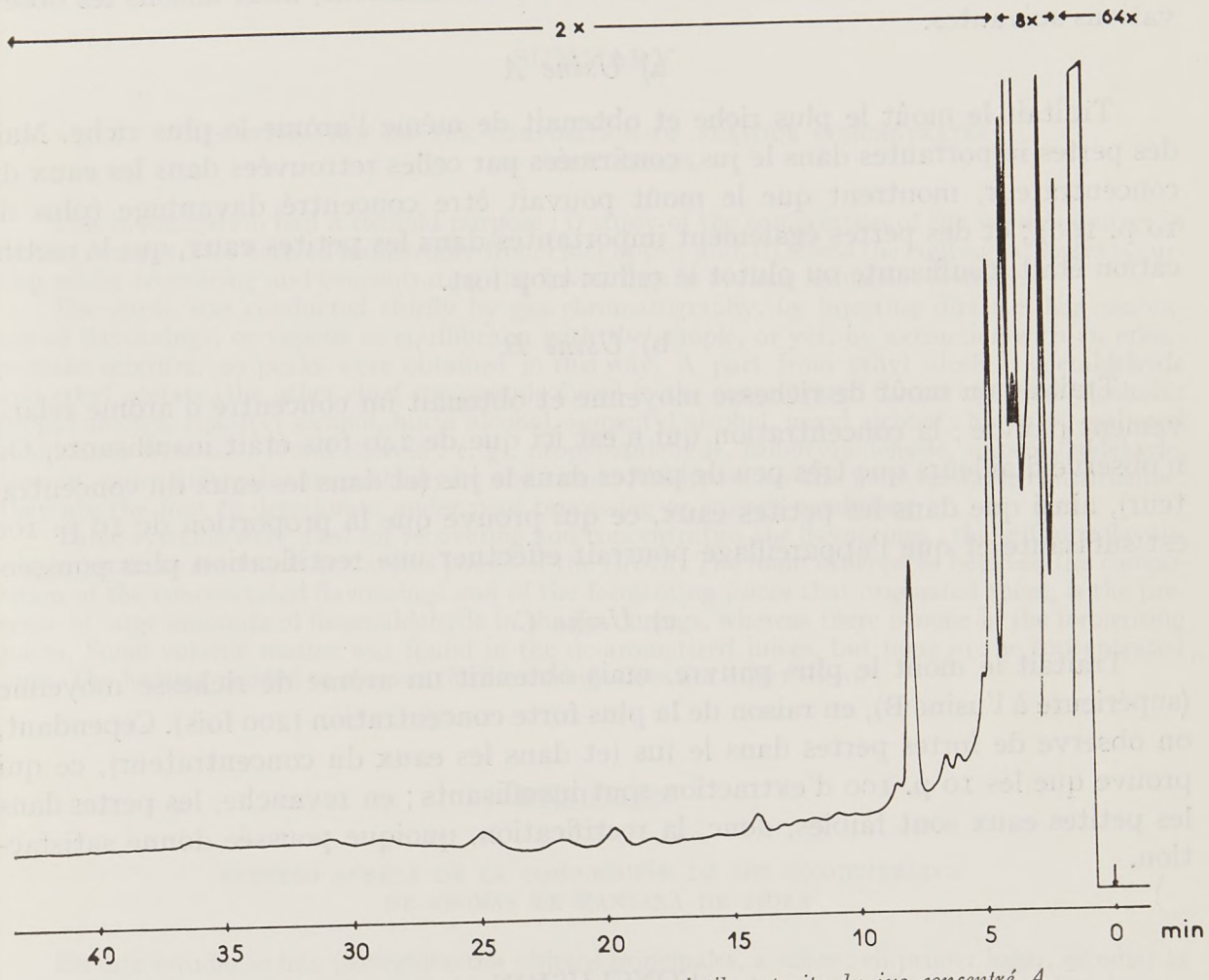


FIG. 16. — *Chromatogramme des constituants volatils extraits du jus concentré* A_2
Extrait éther-pentane ; injection 3µl ; pommes aigres

3. 5. Comparaison de l'efficacité des appareillages

Étant donné l'intensité du chauffage, cependant rapide, qu'ont subi les jus po leur concentration, il est naturel que les concentrés soient dépourvus d'arôme. Ma l'étude de la fraction « eaux du concentrateur » nous a permis de vérifier l'importan des pertes dans le jus. En nous rapportant au schéma général d'extraction, no pouvons conclure que : des pertes importantes dans le jus démontrent que le pou centage d'évaporation des moûts est insuffisant et, des pertes importantes dans l petites eaux, que la rectification est insuffisante ou défectueuse.

Si nous étudions dans ce sens chacune des installations, nous faisons les obse vations suivantes.

a) *Usine A*

Traitait le moût le plus riche et obtenait de même l'arôme le plus riche. Mai des pertes importantes dans le jus, confirmées par celles retrouvées dans les eaux d concentrateur, montrent que le moût pouvait être concentré davantage (plus d 10 p. 100) ; et des pertes également importantes dans les petites eaux, que la rectifi cation était insuffisante ou plutôt le reflux trop fort.

b) *Usine B*

Traitait un moût de richesse moyenne et obtenait un concentré d'arôme relati vement pauvre ; la concentration qui n'est ici que de 140 fois était insuffisante. On n'observe d'ailleurs que très peu de pertes dans le jus (et dans les eaux du concentra teur), ainsi que dans les petites eaux, ce qui prouve que la proportion de 10 p. 10 est suffisante et que l'appareillage pourrait effectuer une rectification plus poussée

c) *Usine C*

Traitait le moût le plus pauvre, mais obtenait un arôme de richesse moyenne (supérieure à l'usine B), en raison de la plus forte concentration (200 fois). Cependant, on observe de fortes pertes dans le jus (et dans les eaux du concentrateur), ce qui prouve que les 10 p. 100 d'extraction sont insuffisants ; en revanche, les pertes dans les petites eaux sont faibles, donc, la rectification, quoique poussée donne satisfac tion.

CONCLUSION

En plus de ces considérations pratiques, nous avions pensé que cette étude nous permettrait peut-être de trouver un indice de qualité des arômes, mais nous n'avons pu en trouver d'autre que la concentration globale en substances volatiles, autres que l'éthanol. Nous ne pouvons pas dire si la teneur en aldéhydes est un facteur déterminant de la qualité : tous nos échantillons d'arôme en renfermaient une quantité équivalente et étaient d'ailleurs considérés comme de bons arômes, représentatifs de la production courante des usines. Des arômes provenant de campagnes antérieures, conservés dans des conditions défavorables, accusaient une nette diminution de la teneur en composés carbonylés, plus forte que celle de tous les alcools et les esters.

En résumé, nous avons pu constater que le chauffage nécessaire à la récupération des arômes n'altérait pas la composition de ceux-ci, puisque nous retrouvons, du moût aux eaux du concentrateur, les mêmes substances, exception faite de l'hexénal qui n'apparaît que dans les arômes et qu'à l'état de traces, dans les jus. Des traces de substances inconnues apparaissent parfois sur les chromatogrammes.

L'extraction des arômes n'est pas sélective. On peut donc sans danger agir sur les pourcentages d'évaporation du moût et de concentration du distillat, pour obtenir la qualité et la richesse désirées.

Reçu pour publication en janvier 1968.

SUMMARY

INVESTIGATION ON THE COMPOSITION OF FLAVOUR CONCENTRATES OF CIDER APPLES

This investigation had a twofold purpose : i) study of the composition of the volatile matter in flavour concentrates derived industrially from cider apples and, ii) assess the contingent losses occurring whilst recovering and concentrating the flavourings in various industrial systems.

The study was conducted chiefly by gas chromatography, by injecting direct either concentrated flavourings, or vapour in equilibrium with the sample, or yet, by extraction with an ether-pentane mixture. 29 peaks were obtained in this way. A part from ethyl alcohol, acetaldehyde and ethyl acetate, the other chief compounds found in the concentrated flavourings were alcohols : propyl alcohol, isobutyl alcohol, butyl alcohol, isopentyl alcohol, hexyl alcohol ; however, carbonyl compounds were also found therein : e. g., propionaldehyde, isobutyraldehyde, isopentylaldehyde, acetoin, capro-aldehyde, hexenaldehyde, and esters. Aldehydes are the more unstable constituents : they are the first to deteriorate under poor processing or storage conditions.

Three systems were used for recovering and concentratins the flavourings ; the selfsame flavouring substances are found at various points of the circuit. The main differences between the composition of the concentrated flavourings and of the fermenting juices that originated them, is the presence of large amounts of hexenaldehyde in the flavourings, whereas there is none in the fermenting juices. Some volatile matter was found in the de-aromatized juices, but none in the concentrated ones. The heating needed to recover the flavourings does not affect them.

RESUMEN

ESTUDIO ACERCA DE LA COMPOSICIÓN DE LOS CONCENTRADOS DE AROMAS DE MANZANA DE SIDRA

En este estudio se han perseguido dos objetos principales, a saber : en primer lugar, estudiar la composición de las substancias volátiles de los concentrados de aromas obtenidos industrialmente a partir de manzanas de sidra y, en segundo lugar, determinar las pérdidas eventuales durante el transcurso de la recuperación y de la concentración de los aromas llevados a cabo mediante distintos sistemas industriales.

El estudio ha sido efectuado utilizando principalmente las técnicas de cromatografia en fase gaseosa, por inyección directa, ya seade concentrado de aromas, o bien, de vapor en equilibrio con la muestra o por extracción con una mezcla eter-pentano. Han sido obtenidos 29 picos. A parte del etanol, el etanal y el acetato de etilo, los cuerpos más importantes que han sido encontrados en los concentrados de aromas son los alcoholes : propanol, isobutanol, butanol, isopentanol, hexanol, pero también se han descubierto ciertos cuerpos carbonilos, como, por ejemplo, el propanal, isobutanal, acetona, butanal, isopentanal, acetoina, hexanal, hexanal y ciertos esteres. Los aldehidos son los componentes más frágiles, alterándose muy rápidamente en malas condiciones de tratamiento y de conservación.

Se han comparado tres sistemas de recuperación y de concentración. En los distintos puntos del circuito, vuelven a encontrarse las mismas substancias de aromas. Las diferencias primordiales entre la composición de los concentrados de aromas y de los mostos de que proceden, residen en la

presencia de hexenal, en cantidad importante en los aromas, substancia que se encuentra ausente en los mostos. Se ha podido aprecial la presencia de una cantidad determinada de substancias volátiles en los zumos desaromatizados, pero no en los zumos concentrados. El caldeo necesario para la recuperación de los aromas no altera los mismos.

RASSIUNTO

STUDIO SULLA COMPOSIZIONE DEI CONCENTRATI D'AROMIDI MELE DA CIDRO

Due scopi principali sono stati conseguiti : da una parte, strudiare la composizione delle sos tanze volatili dei concentrati di aromi ottenuti industrialmente a partir dalle mele da cidro, d'altra parte, determinare le perdite eventuali durante il periodo del ricupero e della concentrazione degli aromi effettuati con diversi sistemi industriali.

Lo studio è stato condotto utilizzando principalmente le tecniche di cromatografia in fase gassosa, per iniezione diretta sia di concentrato d'arome, sia di vapore in equilibrio col campione, oppure per estrazione con una miscela etero-pentano : 29 picchi sono stati ottenuti. All'infuori dell'étanol, l'etanal e l'acetato di etile, i corpi piú importanti, trovate nei concentrati di aromi sono degli alcoli : propanolo, isobutanolo, butanolo isopentanolo, esanalo ; ma si svelano egualmente dei corpi cabonilati come ; il propanolo, isobutanolo, acetone, butanolo, isopentanolo, acetoina, esanalo, et deglo esterii. Le aldeidi soni i costituenti piú fragili, esse si alterano assai presto nelle cattive condizione di trattamento e di conservazione.

Tre sistemi di recupero e di concentrazione d'aromi sono stati paragonati. Nei differenti punti del circuito, le stesse sostanze d'aromi si ritrovano. Le differenze essenziali tra la composizione dei concentrati d'aromi e dei mosti dai quali essi provengono, risiedono nella presenza in quantita importante d'esanalo negli aromi, questa sostanza essendo assente nei mosti. Une certa quantita di sostanze volatili è stata messa in evidenza nei succhi disaromatizzati, ma non nei succhi concentrati. Il riscaldamento necessario al ricupero degli aromi non altera questi ultimi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BASSETTE R., OZERIS S., WHITNAH C. H., 1962. Gas Chromatographic Analysis of Head Space Gas of Dilute Aqueous Solutions. *Anal. Chem.*, **34**, 12, 1540.

BROWN D. S., BUCHANAN J. R., HICKS J. R., 1966. Volatiles from apple fruits as related to variety, maturity and ripeness. *Proc. amer. Soc. hortic. Sci.*, **88**, 98.

DRAWERT F., HEIMANN W., EMBERGER R., TRESSE L. R., 1965. Enzymatische Veränderung des natürlichen Apfelaromas bei der Aufarbeitung *Naturwissenschaften*, **52**, 11, 304.

DRAWERT F., HEIMANN W., EMBERGER R., TRESSE L. R., 1965. Enzymatische Bildung von Hexen-2-al-1 und Hexanal-1 bei der Aufarbeitung von Apfeln. *Z. Naturforsch.* B, **20**, 497.

FEIGL F., 1956. *Spot Tests in Organic Analysis.* Elsevier Amsterdam

FLATH R. A. et *al.*, 1967. Identificazione e valutazione organolettica dei componenti dell'aroma delle mele *Delicious* (en anglais). *J. Agric. Food Chem.*, **15** (1), 29-35.

GOTTAUF M., DUDEN R., 1965. Bildung von Hexanal und trans-hexen-2-al-1 bei der Apfelsaft-bereitung. *Z. Lebensmittel.Untersu-Forsch.*, **128**, 5, 257.

GREVERS G., DOESBURG J. J., 1962. Gas chromatographic Determination of some Volatiles, emanated by stored Apples. *Internation. Federation of Fruit Juice Producers*, Bern, 319.

GREVERS G., DOESBURG J. J., 1965. Volatiles of apples during storage and ripening. *J. Food Sci.*, **30**, 3, 412.

GUADAGNI D. G., OKANO S., BUTTERY R. G., BUR H. K., 1966. Correlation of sensory and gas-liquid chromatographic measurements of apple volatile. *Food Technol.*, **20**, 4, 166.

HOFF J. E., FEIT E. D., 1963. Functional group analysis in gas chromatography. *Anal. Chem.*, **35**, 9, 1298.

HUELIN F. E., 1952. Volatile products of apples. 3. Identification of Aldehydes and Ketones. *Austral. J. Sci. Res.*, B, **5**, 328.

KEENEY M., 1957. Regeneration of carbonyls from 2,4 dinitrophenylhydrazones with levulinic acid. *Anal. Chem.*, **29**, 10, 1489.

KIESER M. E., POLLARD A., 1962. The examination of some Fruit Juice Volatiles by Use of the Flame-Ionisation Detector. *Internation. Federation of Fruit Juice Producers, Bern*, 249.

KOCH J., SCHILLER H., 1964. Beitrag zur Kenntnis des Apfelaromas. *Z. Lebensmittel-Untersu-Forsch.*, **125**, 5, 364.

LOVE S., BRATZELER L. J., 1966. Tentative Identification of Carbonyl Compounds in wood smoke by gas Chromatography. *J. Food Sci.*, **31**, 2, 218.

MEHLITZ A., GIERSCHNER K., 1961. Beitrag zur Qualitaetsbeurteilung von Aromakonzentraten und Aromadestilaten aus Fruchtsaften *Internation. Federation of Fruit Juice Producers*, Wageningen, 51.

MEHLITZ A., GIERSCHNER K., 1962. Weitere Untersuchungen über Aromakonzentrate aus Früchtsäften. *Internation. Federation of Fruit Juice Producers*, Bern, 301.

MEHLITZ A., GIERSCHNER K., MINAS Th., 1964. Gaschromatographische Betriebskontrolle von Aromagewinnungsanlagen. *Internation. Federation of Fruit Juice Producers*, Vienna, 81.

MEIGH D. F., 1956. Volatile compounds produced by apples. 1. Aldehydes and Ketones. *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 396.

MEIGH D. F., 1957. Volatile compounds produced by apples. 2. Alcohols and Esters. *J. Sci. Food Agric.*, **8**, 313.

NAWAR W. W., 1966. Some Considerations in Interpretation of Direct Headspace Gas Chromatographic Analyses of Food Volatiles. *Food Technol.*, **20**, 2, 213.

NISHIMURA K., HIROSE Y., 1964. The aroma constituents of Kogyoku Apples. *Agric. Biol. Chem.*, (Tokyo), **28**, 1, 1.

OSMAN A. E., 1966. Entwicklung von flüchtigen Geschmacksstoffen im Apfel. *Z. Lebensmittel Untersu. Forsch.*, **128**, 6, 333.

PAILLARD N., 1965. Analyse des produits volatils émis par les pommes. *Fruits*, Paris, **20**, 5, 189.

PAILLARD N., 1966. Constituants organiques volatils de l'atmosphère de chambre d'entreposage de fruits munie ou non de dispositifs d'épuration d'air. *Fruits*, Paris, **21**, 4, 167.

PRILLINGER F., HORWATITSCH H., 1965. Gaschromatographische Untersuchungen an Apfelaromakonzentraten und Apfelsäften. *Mitt., Ser. B, Obst Garten*, **15**, 2, 87.

RHOADES J. W., MILLAR J. D., 1965. Gas chromatographic method for comparative analysis of fruit flavors. *J. Agric. Food Chem.*, **13**, 1, 5.

STRACKENBROCK K. H., 1961. Untersuchungen Uber Apfelaromen. Dissertation, Bonn.

STRACKENBROCK K. H., 1961. Nachweis sortenspezifischer Apfelaromen. *Erwerbsobstbau*, **3**, 147.

STRACKENBROCK K. H., 1962. Beurteilung der Aromaqualität von Säften nach verschiedener technologischer Bearbeitung mit Hilfe der Gaschromatographie. *Internation. Federation Fruit Juice Producers*, Bern, 287.

STRACKENBROCK K. H., 1963. Vergleichende Beurteilung von Apfelsäften und Apfelsüssmosten aus konzentrierten Apfelsäften. *Flüssiges Obst.*, **6**, 1.

SUGISAWA H., MCGREGOR D. R., MATTHEWS J. S., 1962. The flavor spectrum of apple-wine volatiles. *J. Food Sci.*, **27**, 4, 355.

SUGISAWA H., MCGREGOR D. R., MATTHEWS J. S., 1964. Apple juice volatiles. *J. Food Sci.*, **29**, 4, 448.

VOGEL A. I., 1959. *Practical Organic Chemistry* Longmans, Londres.

THOMPSON A. R., 1951. Volatile products of apples I. Identification of acids and alcohols. *Austral. J. Sci. Res.*, 283.

WITHE J. W., 1950. Composition of a volatile fraction of apples. *Food Res.*, **15**, 1, 68.

WUCHERPFENNIG K., BRETTHAUER G., 1962. Beitrag über Veränderungen in der Zusammensetzung von Aromadestillaten bei der Verarbeitung von Apfeln in Abhängigkeit von der angewandten Verfahrenstechnik. *Fruchtsaft.Ind.* **6**. 359.

WUCHERPFENNIG K., BRETTHAUER G., 1963. Aromaveränderungen in Apfelsäften und Aromakonzentraten während der Lagerung. *Mitt. Ser. B, Obst Garten*, **13**, 275.

WUCHERPFENNIG K., BRETTHAUER G., 1964. Beitrag zur Veränderung der Aromastoffe in Apfelsäften während der Lagerung. *Internation. Federation Fruit Juice Producers*, Vienne, 105.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (1), 53-66.

ÉVOLUTION DE L'ÉTAT D'OXYDORÉDUCTION ET DES TENEURS EN FLAVONOLS ET EN ANTHOCYANES DU RAISIN AU COURS DE SON DÉVELOPPEMENT

J. MOURGUES, M. BOURZEIX

avec la collaboration technique de P. BARDOU et N. HÉRÉDIA

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Ce mémoire concerne l'étude de l'évolution de l'état d'oxydoréduction et celles des flavonols et anthocyanes du raisin au cours de son développement.

Les résultats relatifs à l'oxydoréduction complètent ceux des recherches des deux années précédentes ; les résultats qui concernent les flavonols constituent les premières données dont nous disposons sur l'évolution de ces colorants jaunes dans le raisin.

INTRODUCTION

Les recherches faites à Narbonne, en 1964 et 1965, sur l'évolution de l'état d'oxydoréduction du raisin suivie par mesure du potentiel redox (DEIBNER, MOURGUES, 1966 *a*, 1967 *a*, *b*) aboutissent aux constatations suivantes :

— au moment de la véraison, la baie évolue vers un état plus réduit ;

— pendant la maturation, l'état d'oxydoréduction subit des fluctuations « en dents de scie » sans que cela puisse être attribué entièrement aux variations de la température ambiante qui déterminent des variations inverses du potentiel.

Mais ces résultats étaient à préciser. Ainsi, en 1966, on a cherché d'une part à compléter l'étude de l'évolution de l'état d'oxydoréduction en commençant les mesures du potentiel redox au début de la croissance herbacée (période qui n'avait pas été étudiée), et d'autre part, à déterminer l'influence éventuelle du cépage sur cet état.

TABLEAU I

Données relatives à la maturation du Carignan gris, *du* Grenache noir, *du* Cinsault, *du* Morastel *et du* Gros-vert

Cépage	*Carignan gris*											
Date	22-6	29-6	6-7	13-7	20-7	27-7	3-8	10-8	17-8	24-8	31-8	7-8
% de baies vérées				0	10	32	74	88	100			
Poids de 100 baies	41	70	108	120	127	147	170	126	233	237	245	234
Glucides en g. dans 100 baies						12,3	19,2	25,6	37,2	39,3	42,3	42,7
Acidité en méq. dans 100 baies	15,5	28,6	47,3	55,3	61,6	55,5	50	39,6	37,1	26,5	26,1	21,6
pH	2,6	2,6	2,5	2,5	2,5	2,6	2,7	2,8	3	3,1	3,2	3,4

Cépages	*Grenache noir*								*Cinsault*						*Morastel*		*Gros-vert*	
Dates	28-7	4-8	11-8	19-8	25-8	1-9	8-9	15-9	9-8	16-8	23-8	30-8	6-9	13-9	3-9	10-9	25-10	3-11
% de baies vérées	13	72	97,8	100					83	100								
Poids de 100 baies	100	139,1	182	205	210	202	205	207	364	407	452	466	493	455	236	256	491	460
Glucides en g dans 100 baies		14,8	25,8	33,9	38,2	39,3	40,6	42,9	38,3	48,1	50,8	67,7	77,9	74,3	33,3	37,2	73,2	69,4
Acidité en méq. dans 100 baies	44,7	40,8	31,2	27,5	25,9	19,2	18,8	16,7	80,4	55,1	48,3	44,7	39,0	30,2	27,8	28,6	37,1	40,6
pH	2,5	2,6	2,8	2,9	3,1	3,1	3,2	3,3	2,9	3	3,2	3,3	3,4	3,5	3,3	3,3	3,2	3,3

TABLEAU 2

Évolution du potentiel rédox des baies de Grenache noir, Cinsault, Morastel, Gros-vert.

Cépages	*Grenache noir*								*Cinsault*						*Morastel*		*Gros-vert*	
Dates	28/7	4/8	11/8	18/8	25/8	1/9	8/9	15/9	9/8	16/8	23/8	30/8	6/9	13/9	3/9	10/9	25/10	3/11
E_H en mV	430 ± 33	402 ± 24	416 ± 35	435 ± 27	389 ± 25	379 ± 12	404 ± 28	368 ± 18	417 ± 30	426 ± 22	397 ± 16	380 ± 20	389 ± 41	361 ± 19	395 ± 10	340 ± 19	366 ± 22	510 ± 17
Température en °C	22,7	24,7	23,7	20,8	22,3	21,1	21	21,4	22,1	23,7	24,6	19,7	25,3	23,8	23,2	25,7	19,8	9,3

TABLEAU 3

Potentiel des baies vertes et vérées pendant la période de véraison

Cépages	*Carignan noir*					*Carignan gris*			*Grenache*		*Cinsault*
Dates	26-7	29-7	2-8	5-8	12-8	27-7	3-8	10-8	28-7	4-8	9-8
E_H baies vertes	392 ± 22 (9)*	417 ± 25 (10)	515 ± 30 (10)	472 ± 38 (4)	454 (1)	452 ± 54 (7)	503 (2)	495 (2)	449 ± 50 (6)	397 ± 25 (10	483 (2)
E_H baies vérées	381 ± 36 (3)*	384 ± 9 (6)	389 ± 16 (6)	387 ± 32 (12)	390 ± 16 (11)	378 ± 10 (5)	392 ± 30 (10)	495 ± 28 (9)	452 (2)	392 ± 22 (10)	404 ± 24 (10)

* Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de mesures utilisées pour calculer l'intervalle de confiance de la moyenne.

TABLEAU 4

Analyse de variance des données du potentiel oxydoréducteur des différents cépages (séries comparées et valeurs de F)

Cépages	Différences hautement significatives (niveau critique de probabilité de 1 %) (P = 0,01)			Différences significatives (niveau critique de probabilité de 5 %) (P = 0,05)
Carignan noir	16-6 et 15-7 : 37,19 8-7 et 15-7 : 29,72 1-7 et 22-7 : 47,23 26-7 et 2-8 : 10,03 26-8 et 2-9 : 9,03 2-8 verts et 2-8 vérés : 47,9	24-6 et 15-7 : 31,87 16-6 et 22-7 : 52,40 8-7 et 22-7 : 47,32 2-8 et 12-8 : 10,80 9-9 et 19-8 : 13,52	1-7 et 15-7 : 30,66 24-6 et 22-7 : 51,27 22-7 et 26-7 : 18,41 12-8 et 26-8 : 10,99 16-9 et 26-9 : 9,03	2-8 et 5-8 : 6,29 19-8 et 26-8 : 5,86 5-8 verts et 5-8 vérés : 7,98
Carignan gris	22-6 et 6-7 : 38,55 13-7 et 20-7 : 36,40 20-7 et 3-8 : 21,83 17-8 et 31-8 : 12,21	29-6 et 6-7 : 18,64 20-7 et 22-7 : 19,41 20-7 et 17-8 : 28,20 10-8 verts et 10-8 vérés : 12,66	6-7 et 13-7 : 12,66 20-7 et 3-8 : 21,83 17-8 et 24-8 : 19,76	31-8 et 7-9 : 7,70 3-8 verts et 3-8 vérés : 8,71
Grenache noir	18-8 et 1-9 : 10,20	18-8 et 15-9 : 15,03	16-8 et 13-9 : 26,86	18-8 et 25-8 : 7,53 4-8 verts et 4-8 vérés : 6,46
Cinsault	16-8 et 30-8 : 12,08	16-8 et 6-9 : 11,12		16-8 et 23-8 : 5,46 7-8 verts et 7-8 vérés : 7,10
Morastel	3-9 et 10-9 : 21,56			
Gros-vert	25-10 et 3-11 : 48,04			
Comparaison des potentiels rédox des cépages à maturité	*Carignan noir — Carignan gris* : 10,62 *Carignan noir — Gros-vert* : 43,6			*Carignan noir — Morastel* : 5,2

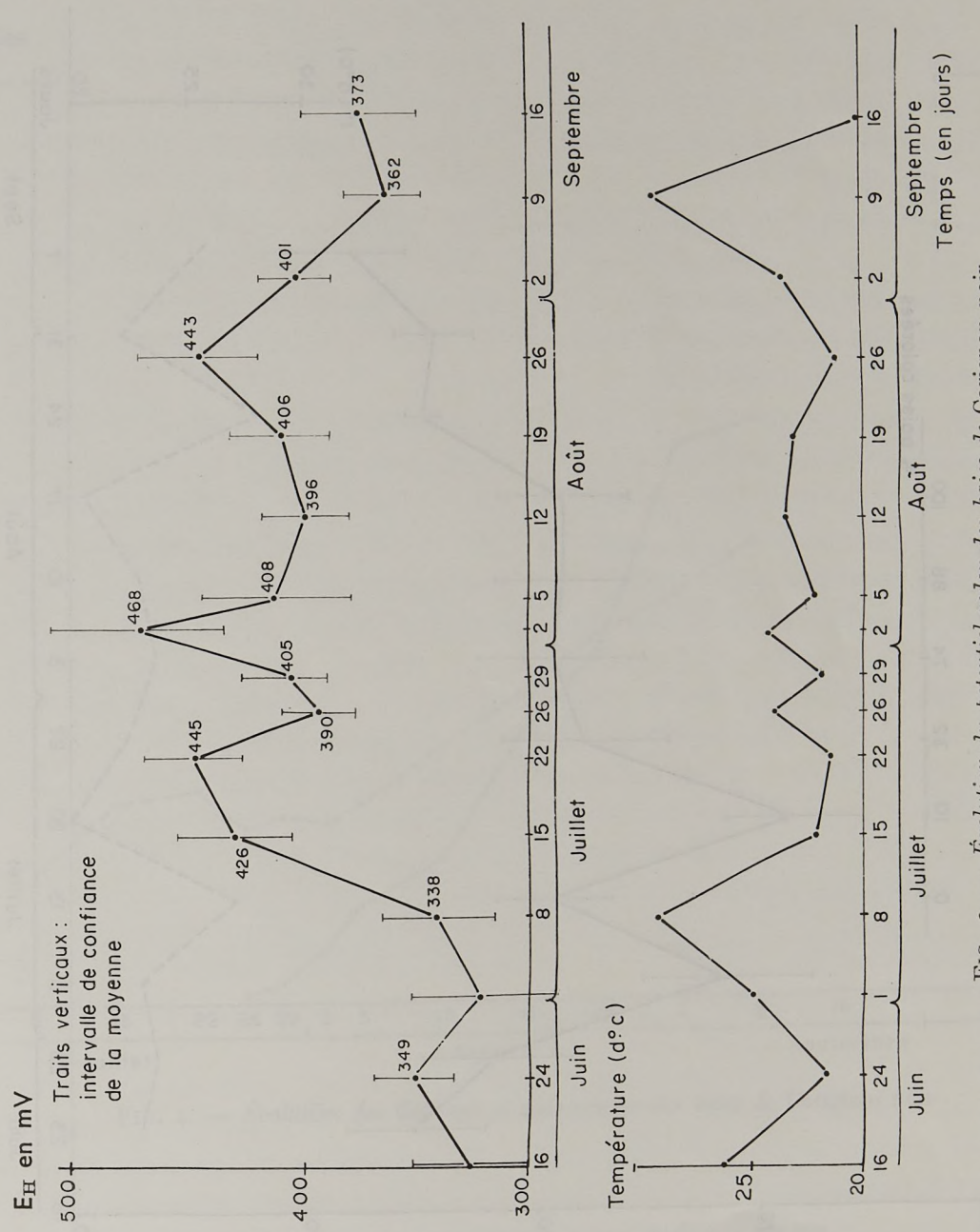


FIG. 2. — *Évolution du potentiel redox des baies de* Carignan noir

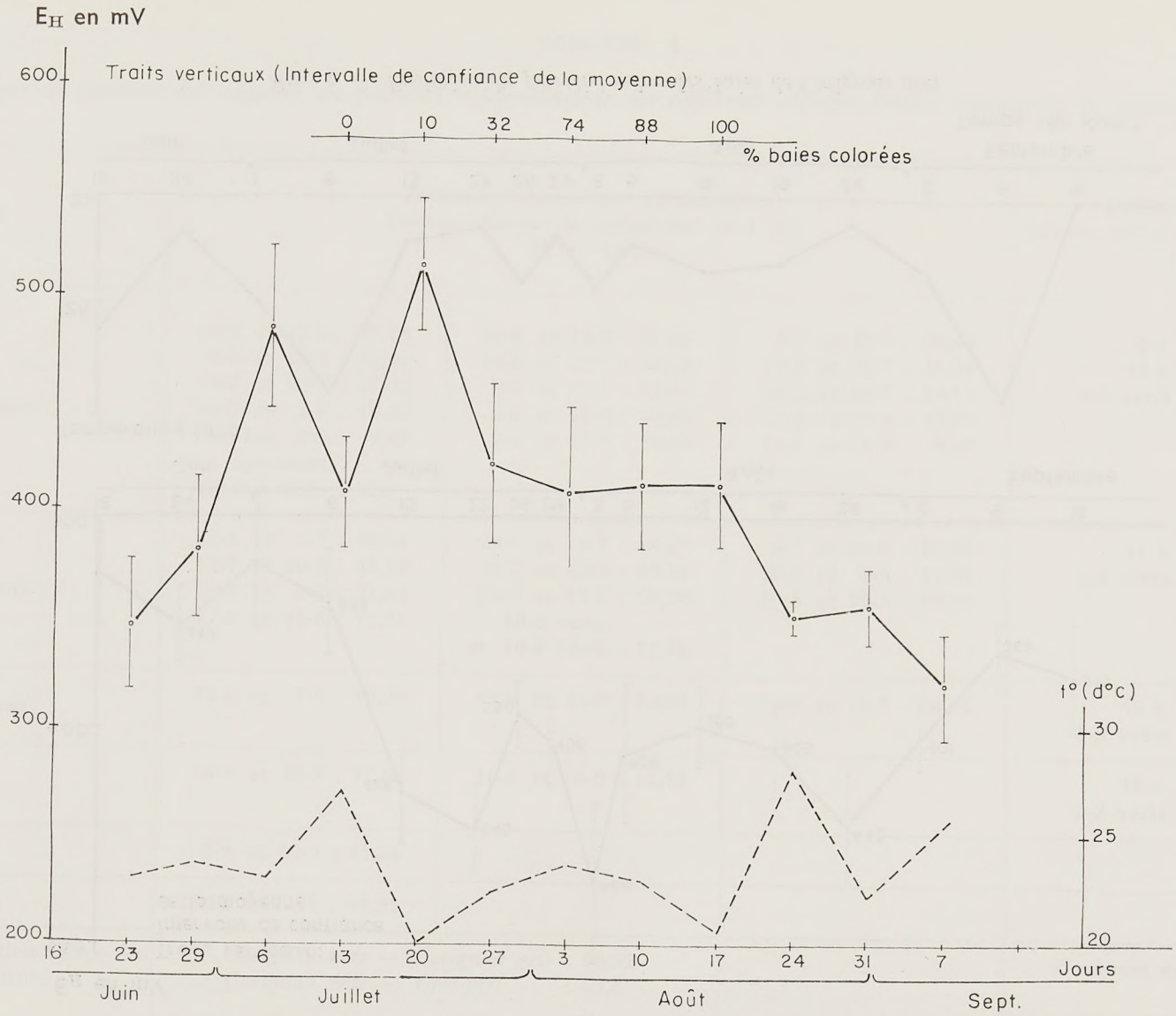


FIG. 3. — *Évolution du potentiel redox des baies de* Carignan gris

Les figures 2, 3 et le tableau 2 donnent l'évolution du potentiel redox ainsi que l'intervalle de confiance de la moyenne des mesures sur chaque cépage ; le tableau 3 indique les potentiels des baies vertes et vérées déterminées le même jour, et le tableau 4 les résultats d'une analyse de variance de toutes les données.

La figure 4 montre l'évolution respective des flavonols et des anthocyanes des pellicules de baies de *Carignan noir* (1966). L'évolution des flavonols du *Grenache blanc* (1967) est indiquée, dans le texte, au cours de la discussion.

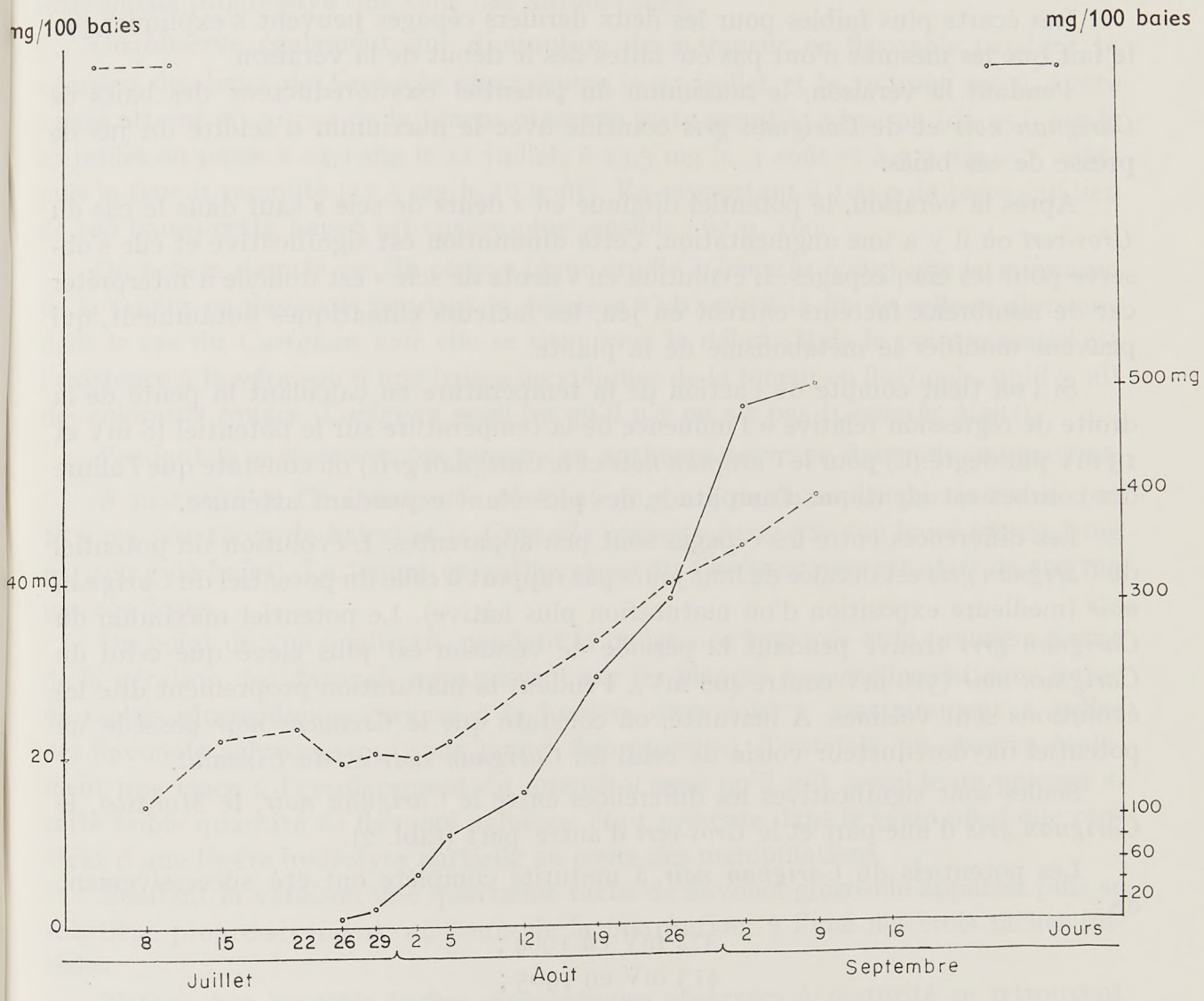


FIG. 4. — *Évolution des flavonols et anthocyanes des baies de* Carignan noir

III. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

1. *Évolution de l'état d'oxydoréduction, comparaison des cépages*

D'après les tableaux 1 et 2 et la figure 1, on constate qu'après un palier au début de la croissance herbacée des baies, le potentiel augmente avant la véraison dans le cas des deux cépages étudiés, le *Carignan noir* et le *Carignan gris*. Il y a donc évolution vers un état plus oxydé.

Au moment de l'apparition de la coloration rouge (véraison), le potentiel moyen accuse une baisse hautement significative (de 445 à 390 mV dans le cas du *Carignan noir*, de 516 à 422 mV pour le *Carignan gris*) ; la baie va vers un état plus réduit.

Pendant la période de véraison, les baies vertes ont des potentiels beaucoup plus élevés que les baies vérées, les écarts maxima étant respectivement de :

126 mV pour le *Carignan noir* — 108 mV pour le *Carignan gris*
60 mV pour le *Grenache* — 79 mV pour le *Cinsault*.

Les écarts plus faibles pour les deux derniers cépages peuvent s'expliquer par le fait que les mesures n'ont pas été faites dès le début de la véraison.

Pendant la véraison, le maximum du potentiel oxydoréducteur des baies de *Carignan noir* et de *Carignan gris* coïncide avec le maximum d'acidité du jus de presse de ces baies.

Après la véraison, le potentiel diminue en « dents de scie » sauf dans le cas du *Gros-vert* où il y a une augmentation. Cette diminution est significative et elle s'observe pour les cinq cépages. L'évolution en « dents de scie » est difficile à interpréter car de nombreux facteurs entrent en jeu, les facteurs climatiques notamment, qui peuvent modifier le métabolisme de la plante.

Si l'on tient compte de l'action de la température en calculant la pente de la droite de régression relative à l'influence de la température sur le potentiel (8 mV et 13 mV par degré (C) pour le *Carignan noir* et le *Carignan gris*) on constate que l'allure des courbes est identique, l'amplitude des pics étant cependant atténuée.

Les différences entre les cépages sont peu apparentes. L'évolution du potentiel du *Carignan gris* est décalée de huit jours par rapport à celle du potentiel du *Carignan noir* (meilleure exposition d'où maturation plus hâtive). Le potentiel maximum du *Carignan gris* trouvé pendant la période de véraison est plus élevé que celui du *Carignan noir* (516 mV contre 468 mV). Pendant la maturation proprement dite les évolutions sont voisines. A maturité, on constate que le *Grenache noir* possède un potentiel oxydoréducteur voisin de celui du *Carignan noir* et du *Cinsault*.

Seules sont significatives les différences entre le *Carignan noir*, le *Morastel*, le *Carignan gris* d'une part et le *Gros-vert* d'autre part (tabl. 2).

Les potentiels du *Carignan noir* à maturité complète ont été successivement de :

372 mV en 1964 ;
413 mV en 1965 ;
373 mV en 1966.

Ils sont, semble-t-il, en relation avec les conditions climatiques de l'année, les années où la maturation s'effectue dans des conditions favorables comme en 1964 et 1966, étant caractérisées par des valeurs basses du potentiel.

2. *Evolution des flavonols et anthocyanes*

Avant la véraison le raisin contient déjà des flavonols (le *Carignan noir* présente, juste avant la véraison, une teneur de 23,4 mg pour 100 baies ou 19,9 mg par 100 g de baies et le *Grenache blanc* 15,6 mg ou 12,7 respectivement).

A la véraison, il y a une diminution de la teneur en flavonols qui atteint 17 p. 100 (24 p. 100 si on se rapporte à 100 g de baies). Cette baisse se produit pendant les quatre premiers jours de la véraison ; ensuite la teneur est sensiblement stable pendant une semaine (par contre si on se rapporte à 100 g de baies on observe une diminution continue pendant cette même semaine, puisqu'on passe de 15 mg à 13,5 mg pendant les trois premiers jours et de 13,5 à 11,9 pendant les quatre jours suivants.

Après la véraison il y a, à nouveau, une augmentation de la teneur en flavonols mais moins progressive que celle des anthocyanes.

On observe également une diminution de la teneur en flavonols pendant la véraison des baies de *Grenache blanc* (entre le 27 juillet et le 10 août 1967). Cette baisse atteint 50 p. 100 de la teneur observée juste avant la véraison (de 15,6 mg le 27 juillet on passe à 14,1 mg le 31 juillet, à 13,3 mg le 3 août et à 7,0 mg le 7 août) puis la teneur remonte (17,5 mg le 10 août). En rapportant à 100 g de baies (au lieu de 100 baies) cette baisse est encore plus sensible : 62 p. 100.

On notera dans le cas du cépage blanc étudié (*Grenache blanc*) que le minimum de la teneur en flavonols pendant la véraison s'observe à la fin de celle-ci, alors que dans le cas du *Carignan noir* elle se situe vers le début. Mais le point essentiel est l'existence à la véraison d'une baisse inexpliquée de la teneur en flavonols, qu'il y ait des colorants rouges (*Carignan noir*) ou qu'il n'y en ait pas (*Grenache blanc*).

Pendant la *maturation*, les teneurs en anthocyanes et en flavonols augmentent.

A maturité le *Carignan noir* contient 50,3 mg de flavonols par 100 baies (ou 18,5 mg par 100 g de baies) et le *Grenache blanc* 57,8 mg par 100 baies (ou 23,4 mg par 100 g de baies). La teneur en anthocyanes du *Carignan noir* est alors de 502 mg par 100 baies.

Du point de vue qualitatif, pendant la croissance herbacée et la première partie de la véraison, les *flavonols* apparaissent sur les plaques essentiellement sous forme de taches glucosidiques (brunes à la lumière ultraviolette contrairement à celles des flavonols aglucones qui sont jaunes fluorescentes). Toutefois, on observe également une trace à l'emplacement du quercétol sans qu'il soit possible de préciser si cette faible quantité de flavonol aglucone était présente dans le grain ou si elle provient d'une légère hydrolyse partielle au cours des manipulations.

Pendant la véraison une quatrième tache de flavonol glucoside apparaît puis se substitue progressivement, au cours de la maturation, à l'une des trois taches initiales.

Notons que les trois taches glucosidiques observées à maturité se retrouvent aux mêmes emplacements et avec le même aspect (à la lumière du jour et aux UV avec ou sans révélation par l'ammoniac) sur les plaques obtenues à partir des raisins des autres cépages méridionaux étudiés par ailleurs, rouges ou blancs, de *Vitis vinifera* ou hybrides.

A l'approche de la maturité, on note la présence de trois taches légères de flavonols aglucones : celles du quercétol, du myricétol et du kaempférol. Il n'est pas possible de préciser si ces faibles quantités de flavonols aglucones étaient présentes dans la baie ou si elles proviennent d'hydrolyses partielles ultérieures. Leur présence rend vraisemblable l'hypothèse selon laquelle les trois flavonols glucosides ont pour noyaux aglucones, le quercétol (2 OH), le myricétol (3 OH), et le kaempférol (1 OH), dont la présence avait été signalée par P. Ribéreau-Gayon en 1964.

CONCLUSION

Cette étude conduit à des observations originales qu'il conviendrait de vérifier par un grand nombre de mesures.

Au cours de la *croissance herbacée*, la baie évolue vers un état de plus en plus oxydé ; à la *véraison*, le raisin va vers un état plus réduit. Pendant la véraison, on constate que les baies vérées ont un potentiel d'oxydoréduction plus faible que celui des baies vertes. Après la véraison, il y a une tendance à la diminution. Le potentiel d'oxydoréduction suivrait grossièrement l'évolution des acides, mais le profil de la courbe est beaucoup plus étalé, ce qui tend à montrer que d'autres facteurs jouent à côté de l'acidité. Le rapprochement avec les pigments colorés seuls serait très aléatoire et fortuit ; les interférences des divers constituants et facteurs qui interviennent dans l'établissement de l'état d'oxydoréduction de la baie de raisin sont trop nombreuses, et sans doute aussi trop importantes, relativement à celles de ces deux familles de polyphénols.

Les potentiels oxydoréducteurs des six cépages arrivés à maturité présentent quelques différences, mais l'influence des conditions climatiques au moment des mesures est peut-être plus importante que la part qui revient au cépage.

En ce qui concerne l'évolution des colorants rouges et jaunes, retenons simplement l'apparition des flavonols avant celle des anthocyanes, la diminution de la teneur de ces colorants jaunes au cours de la véraison suivie de son augmentation jusqu'à maturité.

Ces phénomènes n'avaient, à notre connaissance, pas encore été signalés dans le cas du raisin (dans celui des feuilles de *Pisium Sativum*, MOORE avait observé la baisse des flavonols au moment où apparaissent les anthocyanes et PECKET avait fait en 1965 une constatation analogue dans les pétales de *Lathyrus odoratus*).

L'évolution quantitative globale des colorants rouges confirme les résultats déjà connus.

L'étude de la formation des colorants jaunes et rouges du raisin, dont l'intérêt a été souligné, doit pouvoir être reprise au niveau des précurseurs communs : les flavanonols. Jusqu'à ce jour on ne dispose d'aucun renseignement sur l'évolution de ces précurseurs dans le raisin. Par ailleurs il convient de développer l'étude des moyens de séparation et de dosage individuel des anthocyanes.

Reçu pour publication en avril 1968.

SUMMARY

EVOLUTION OF THE STATE OF OXYDOREDUCTION IN THE SAME WAY AS FLAVONOL AND ANTHOCYANIN CONTENTS DURING MATURATION OF GRAPES

The results of research carried out in 1966 and 1967 described in this article are concerned with the development of the state of oxydoreduction and the related development of flavonols and anthocyanin. The section covering oxydoreduction supplements the results obtained in 1964 and 1965.

The results on flavonols are in fact the first data we have on the development of these polyphenols in the grape.

The berry evolves towards an increasingly oxidized condition during herbaceous growth. It already contains flavonols.

When the grape begins to ripen the condition rapidly reduces. Whether anthocyanin are formed or not, the flavonols diminish and reach a minimum.

During the ripening process the redox potential evolves in a « saw-tooth » pattern. A continuous increase of the flavonol and anthocyanin contents takes place.

At maturity, three of the variety studied show the same redox potential, two had lower potentials and one (late maturing) a higher potential.

In our present state of knowledge it is not possible to establish a connexion bettween the development of the redox potential and the development of the two families of polyphenols studied because of the many interferences. As things stand, if progress is to be made it will be necessary to make a separate study of the role and quantitative importance of the various constituents and factors which determine the state of oxydoreduction of the berry.

RESUMEN

EVOLUCIÓN DEL ESTADO DE OXIDORREDUCCIÓN Y DE LOS CONTENIDOS DE FLAVONOLES Y DE ANTOCIANOS DE LA UVA DURANTE EL TRANSCURSO DE SU CRECIMIENTO

Los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en 1966 y 1967 y descritas en este artículo, se refieren a la evolución del estado de oxidorreducción y, asimismo, aquella de los flavonoles y antocianos de la uva durante el transcurso de su crecimiento. La parte consagrada a la oxidorreducción constituye un complemento de los resultados obtenidos en 1964 y 1965. Los resultados relativos a los flavonoles constituyen, en realidad, las primeras indicaciones que tenemos acerca de la evolución de estos polifenoles en la uva.

Durante el transcurso del crecimiento herbáceo, la baya evoluciona hacia un estado cada vez más oxidado y, en este estado, ya contiene los flavonoles.

Llegado el envero, la uva evoluciona bruscamente hacia un estado más reducido. Haya o no formación de antocianos, los flavonoles disminuyen y pasan por un punto mínimo.

Durante la maduración, el potencial redox sufre una evolución « en dientes de sierra ». Los flavolonoles y los antocianos aumentan en porcentaje de forma continua.

Tres de las cepas estudiadas en su madurez presentan los mismos potenciales redox, dos tienen potenciales más reducidos y una cepa (de maduración tardía) acusa en cambio un potencial más elevado.

En el estado actual de nuestros conocimientos, no existe la possibilidad de establecer una correlación entre la evolución del potencial redox y aquella de las dos familias de polifenoles estudiados, debido al gran número de interferencias existentes. En la etapa presente, es preciso, para poder progresar, estudiar separadamente el papel y la importancia de los diversos componentes y factores que determinan el estado de oxidorreducción de la baya.

RASSIUNTO

EVOLUZIONE DELLO STATO D'OSSIDORIDUZIONE E DEI TENORI IN FLAVONOLI E DEGLI ANTOCIANI DELL'UVA DURANTE IL SUO SVILUPPO

I risultati delle ricerche fatte nel 1966 e 1967 e descritti in questo articolo concernono l'evoluzione dello stato d'ossidoriduzione e quella dei flavonoli e degli antociani dell'uva nel corso del suo sviluppo. La parte consacrata all'ossidoriduzione costituisce un complemento dei risultati ottenuti nel 1964 e 1965. I risultati relativi ai flavonoli sono infatti le prime indicazioni che noi abbiamo sull' evoluzione di questi polifenoli nell'uva.

Durante la crescenza erbacea la bacca evolve verso uno stato di più in più ossidato. Essa contiene gli dei flavonoli.

Alla prematurazione l'uva bruscamente evolve verso uno stato più ridotto, che ci sia o no formazione d'antociani, i flavonoli diminuiscono e passano per un minimo.

Durante la maturazione il potenziale « redox » evolve a denti di sega. I flavonoli e gli antocian vedono il loro tenore aumentare in modo continuo.

Alla maturità tre dei maglioli studiati hanno gli stessi potenziali redox, due hanno dei potenziali più deboli e un magliolo (a maturazione tardiva) ha un potenziale più elevato.

Nello stato attuale delle nostre conoscenze, non è possibile stabilire un legame tra l'evoluzione del potenziale redox e quella delle due famiglie di polifenoli studiate, a causa del grande numero d'interferenze. Allo stadiopresente, è necessario, per potere progredire, di studiare separatamente il compito e l'importanza dei diversi costituenti e fattori che determinano lo stato d'ossido-riduzione della bacca.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENVEGNIN L., CAPT E., 1955. L'échantillonnage à la vigne pour l'évaluation de la maturité du raisin sur cep. *Rev. Rom. Agric. Vitic. Arbor.*, **13**, n° 2.

BOURZEIX M., 1967. Le dosage des flavonols des vins. *Ann. Technol. agric.* **16**, n° 4, 349-355.

BOURZEIX M., BANIOL P., 1966. L'isolement des flavonols du vin par chromatographie sur couche mince de cellulose. *Ann. Technol. agric.*, **15**, n° 2, 211-217.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1966. Über die Gesamtextraktion der anthocyane aus den Schalen von roten Weintrauben (Sur l'extraction des anthocyanes des pellicules des raisins rouges). *Mitt. Klosterneuburg*, **16**, 200-206.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1966 *a*). Étude du potentiel physiologique de la vigne *in situ* et à l'abri de l'air. Évolution du potentiel des baies de raisin rouge au cours de la maturation. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, série D, 2597-2600.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1966 *b*) Sur la mesure électrométrique du potentiel physiologique des végétaux supérieurs et en particulier de la vigne *in situ* et à l'abri de l'air. *C. R. Acad. Sci.*, **262**, série D, 2353-2356.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1966. *c*) Sur la mesure électrométrique du potentiel physiologique des végétaux supérieurs et en particulier de la vigne *in situ* et à l'abri de l'air. *Rev. gén. Bot.*, **73**, 64[illegible]-679.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1967. *a*) Étude du potentiel physiologique de la vigne *in situ* et à l'abri de l'air. Évolution du potentiel des baies de raisin rouge au cours de la maturation. A. Expérimentation en 1964. *Rev. gén. Bot.*, **74**, 30-56.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1967 *b*) Étude du potentiel physiologique de la vigne *in situ* et à l'abri de l'air. Évolution du potentiel des baies de raisin rouge au cours de la maturation. B. Expérimentation en 1965. Conclusions générales. *Rev. gén. Bot.*, **74**, 57-80.

HUGLIN P., JULLIARD B., 1955. Étude de la morphologie, la phénologie et la productivité des principaux cépages de *Vitis vinifera* L. cultivés en Alsace. *Ann. Amélior. Plantes*, **5**, n° 1, 5-51.

HUGLIN P., JULLIARD B., 1959. Contrôle de la maturation du raisin par le prélèvement des baies. *Prog. agric. Vitic.*, **152**, 11-16, 37-41.

KLEIN A. O., HAGEN C. E., 1961. Anthocyanin production in detached petals of *Impatiens Bolsaminas* L. *Plant Physiol.*, **36**, 1-9.

LISON L., 1958. *Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse des résultats* Gauthier-Villars, Ed. Paris.

PECKET R. C., 1955. Development of anthocyanin pigmentation in flowers of *Lathyrus odoratus*. *J. exper. Bot.*, **17**, n° 50, 177-184.

POUX C. Le produit de base : le raisin mûr. Les aspects modernes de l'Œnologie. *Bull. tech. Inform. Ing. Serv. agric.*, n° 196, 49-54.

PUISSANT A., LEON H., 1967. La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Ann. Technol. agric.*, **16**, n° 3, 217-225.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. *Rev. gén. Bot.*, **5**, 53-645, Thèse Sci. Paris.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6**, 211-244.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. chim. Fr.*, **9**, 2649-2652.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (1), 67-75.

RIBOFLAVINE PENDANT LA FERMENTATION DU JUS DE RAISIN ET LA CONSERVATION DU VIN SUR LIES

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La riboflavine est déterminée au cours de la fermentation du jus de raisin, dans les lies en fin de fermentation, puis dans les vins au fur et à mesure de leur conservation au contact des lies après agitation.

INTRODUCTION

La riboflavine se trouve en faible quantité dans le jus de raisin frais, mais augmente au cours de la fermentation alcoolique, de telle sorte que le vin est considéré comme une boisson d'une valeur appréciable en ce qui concerne la vitamine B_2 (Flavier, 1939 ; Genevois et Flavier, 1939 ; Morgan et *al.*, 1939 ; Cailleau et Chevillard, 1949 ; Castor, 1953 ; Lafourcade et Peynaud, 1957).

C'est Flavier qui le premier, dès 1939, a mis en évidence cette libération de vitamine B_2 par la levure, qui permet d'obtenir des vins 4 ou 5 fois plus riches que les jus dont ils sont issus.

Cependant quelques auteurs sont en contradiction avec cette théorie : Lodi (1943) et Sisakian et *al.* (1950) constatent une diminution de vitamine B_2 pendant la fermentation, tandis que Hall et *al.* (1956) trouvent peu ou pas de changement ; ces derniers admettent seulement une contribution des pellicules.

Perlman et Morgan (1945) ne retrouvent pas l'augmentation de riboflavine pendant la fermentation, que l'un d'eux avait constatée en 1939 (Morgan et *al.*, 1939).

Pour Castor (1953) la levure synthétise, puis libère, de la riboflavine dans le milieu en fermentation, et la macération de la vendange au cours de la fermentation est susceptible également de céder de la riboflavine.

D'après LAFOURCADE et PEYNAUD (1957), les conditions de vinification ne semblent pas influer beaucoup sur la teneur finale du vin, en particulier les vins provenant du pressurage de la vendange fermentée ne sont pas plus riches que les vins de goutte. Il paraît probable que la riboflavine provient uniquement des cellules de levures et non de l'extraction de la partie solide de la vendange. La formation de vitamine B_2 est en rapport avec le développement des levures, elle est plus élevée dans les fermentations aérées qu'en anaérobiose.

D'autre part, POUX et *al.* (1964) pour les acides aminés, OURNAC, FLANZY (1967) pour la vitamine B_1, ont montré que les levures qui absorbent ces corps présents dans le jus de raisin, au cours de la fermentation, peuvent les restituer au vin, dans des proportions variables, pendant la conservation. Il nous a alors paru intéressant de considérer ces études dans le cas de la vitamine B_2. Le problème est un peu différent : il s'agit de voir si les levures continuent à libérer de la riboflavine après la fin de la fermentation, au cours d'un séjour au contact du vin, et de déterminer l'importance de l'enrichissement ainsi provoqué, s'il a lieu.

Cette recherche prend d'autant plus d'intérêt que l'on connaît l'importance du rôle joué par la vitamine B_2 dans l'organisme humain et que l'on sait que le rendement de sa synthèse par les microorganismes de l'intestin chez l'homme est insuffisant et qu'un apport alimentaire est toujours nécessaire. De plus la vitaminogenèse intestinale reste soumise à des conditions variées qui vont en régler l'existence et l'intensité, et il est loin d'être toujours démontré et en toute certitude que le sujet peut absorber et utiliser la vitamine élaborée.

I. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les essais ont été poursuivis pendant deux années consécutives, avec des modalités légèrement différentes.

Essais 1965

On a abandonné à la fermentation, sans addition d'aucun produit, deux séries d'essais, les uns constitués par le jus seul, les autres par la vendange éraflée et foulée. La fermentation était alors provoquée par la flore naturelle du fruit. Chaque essai était réalisé dans une bonbonne de 20 litres, la température était maintenue à 25°C. La riboflavine était évaluée tous les jours pendant 14 jours, sans qu'aucune manipulation soit effectuée sur les vins.

La fermentation était terminée dès le 10e jour, les vins sont encore restés sur leurs lies pendant 4 jours, puis on a procédé à la première remise des lies en suspension pour les vins de goutte et au pressurage pour les vins de macération qui se trouvaient ainsi, eux aussi, brassés avec les lies. Par la suite, tous les deux mois les dosages étaient de nouveau effectués et chaque fois les bourbes remises en suspension. Les cépages utilisés sont : *Terret*, *Aramon*, *Carignan*, *Morastel* (du Domaine expérimental de l'I. N. R. A., Pech-Rouge).

Essais 1966

Les essais ont été réalisés uniquement sur jus de goutte, la riboflavine a été dosée sur les bourbes des vins dès la fin de la fermentation, ce qui a permis d'évaluer la vitamine totale produite pendant la fermentation, ainsi que celle retenue par les levures après séjour sur lies. Les cépages utilisés sont : *Listan*, *Aramon*, *Cinsault* (Domaine expérimental de l'I. N. R. A., Pech-Rouge).

Le dosage de la riboflavine a été réalisé par la méthode fluorométrique telle qu'elle est décrite par OURNAC, DECOR, 1967. Sur les jus frais, les prélèvements en fermentation et les bourbes, les deux hydrolyses, acide et enzymatique, ont dû être pratiquées ; sur les vins terminés seule l'hydrolyse enzymatique a été nécessaire.

TABLEAU 2 (Essais 1965)

Évolution de la riboflavine (en µg par litre) pendant la fermentation et quelques jours après la fin de la fermentation

Cépages	Jus frais initial	Pendant la fermentation (en jours)									Après la fermentation (en jours)			
		1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10e	11e	12e	13e	14e
Terret															
Goutte	55	80	85	85	85	90	88	90	100	105	110	120	135	140	160
Macéré	55	70	96	112	115	110	125	120	125	150	170	180	187	210	215
Aramon															
Goutte	50	74	107	126	140	150	175	178	180	220	230	230	242	245	248
Macéré	50	100	131	178	185	182	185	200	226	230	250	264	260	255	255
Carignan															
Goutte	70	83	131	138	162	177	187	222	250	257	250	270	307	314	318
Macéré	60	95	125	150	190	205	222	250	255	250	245	250	255	250	275
Morastel															
Goutte	66	100	105	150	165	168	170	200	227	230	245	250	250		
Macéré	60	88	97	145	145	150	160	190	196	195	195	200	200		

TABLEAU 3 (Essais 1965) et TABLEAU 4 (Essais 1966)

Évolution de la riboflavine (en µg par litre) *pendant la conservation des vins*

Cépages	Vins dès la fin de la fermentation	Vins restés 4 jours sur lies après la fin de la fermentation	Vins n° 1 restés sur lies avec agitations			Vins restés 2 mois sur lies et 4 mois séparées des lies (provient du vin n° 2)
			2 mois sur lies 1 agitation	4 mois sur lies 2 agitations	6 mois sur lies 3 agitations	
		Vin n° 1	Vin n° 2	Vin n° 3	Vin n° 4	
Terret	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Goutte	110	160	180	165	160	150
Macéré	170	215	190	205	175	170
Aramon						
Goutte	230	248	270	270	275	280
Macéré	250	255	280	285	245	270
Carignan						
Goutte	250	318	330	320	325	300
Macéré	245	275	265	290	260	270
Morastel						
Goutte	245	250	260	230	250	240
Macéré	195	200	200	195	190	175

Évolution de la riboflavine (en µg par litre) *pendant la fermentation et la conservation des vins*

Cépages	Jus frais initial	Pendant la fermentation (en jours)														4 jours après la fin de la fermentation Vin T	Vins restés 3 mois sur lies après agitation Vin A	Total Vin + lies
		1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10e	11e	12	13e	14e	15e			
Listan	50	71	74	74	74	81	87	111	120	125		140					260 (15e jour)	300	322
Aramon ...	66	75	100	120	150	187	190	190	197	200	222			240		245	325 (19e jour)	335	395
Cinsault....	65	80	124	134	156	160	165	165	170	170				211			300 (17e jour)	320	390

II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont réunis dans les tableaux 1, 2, 3, 4, 5, 6 et sur les figures 1, 2. Le tableau 1 représente la composition acides-sucres des jus de raisin utilisés.

TABLEAU 1

Composition acides-sucres des jus utilisés

	Essais 1965				Essais 1966		
	Terret	*Aramon*	*Carignan*	*Morastel*	*Listan*	*Aramon*	*Cinsault*
Acidité totale méq/litre ...	77	79	76	137	112	120	88
Sucres g/litre.....	197	160	193	162	195	186	220
Degré alcoolique du vin correspondant (°C).....	11,6	9,4	11,3	9,5	11,5	10,9	12,9

Voici ce que l'on constate :

1° *Au cours de la fermentation alcoolique*, la teneur en riboflavine du jus de raisin augmente continuellement et régulièrement, ce qui est bien admis par la plupart des auteurs. La teneur du vin se trouve trois à cinq fois plus élevée que celle du jus initial (tabl. 2 et 4. Fig. 1, 2).

2° *Les vins provenant de la vendange entière* et ceux provenant uniquement du jus de goutte ont des teneurs en riboflavine ne présentant pas de différences significatives ; dans certains cas les premiers sont plus riches, dans d'autres c'est le contraire, et parfois leurs teneurs sont identiques. On ne perçoit pas d'apport systématique de riboflavine par les pellicules.

On a essayé de déterminer l'importance que pourrait avoir cet apport s'il avait lieu, d'après les résultats obtenus au cours de l'étude sur la riboflavine dans le raisin pendant la maturation par Ournac, Decor (1967). On voit (tabl. 5) que les pellicules

TABLEAU 5

Enrichissement possible des vins en riboflavine par les constituants solides (pulpe + pellicule) *du raisin mûr*
Calculé d'après Ournac, Decor 1967 (9e prélèvement)

Cépages	Volume du jus donné par 100 baies (en ml)	µg de riboflavine dans « pulpe + pellicule » de 100 baies	µg de riboflavine dans « pulpe + pellicule » correspondant à 1 l de jus
Terret	210	13	62
Aramon.....	287	15	52
Carignan	160	15,5	96
Morastel.....	178	11	91

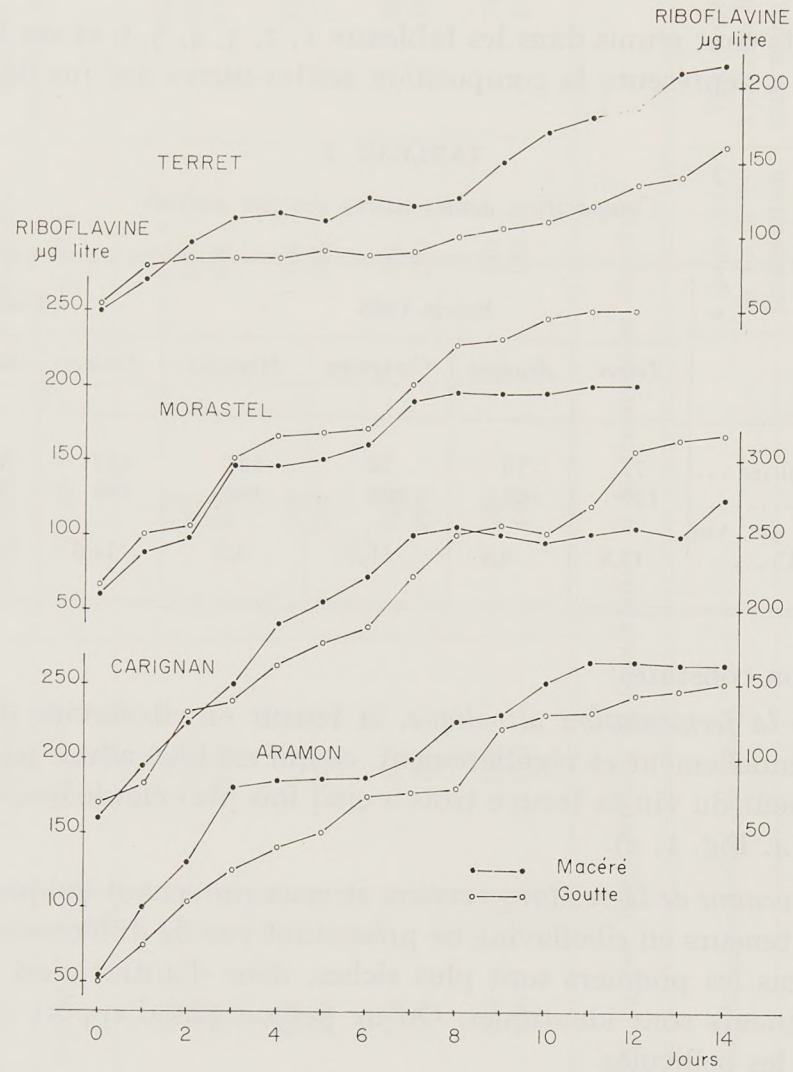


FIG. 1. — *Essais* 1965. *Riboflavine en µg/litre pendant la fermentation*

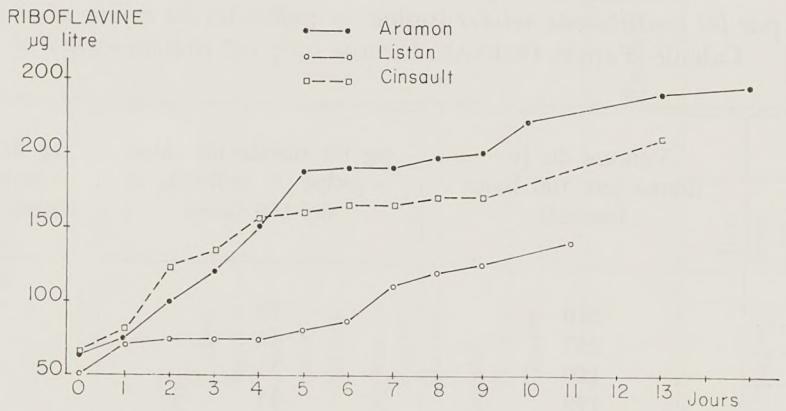


FIG. 2. — *Essais* 1966. *Riboflavine en µg/litre pendant la fermentation*

pourraient fournir au vin une quantité maximum de riboflavine variant de 50 à 95 µg par litre. Étant donné que la riboflavine que renferme la pellicule du raisin est liée aux protéines, comme cela a été constaté par OURNAC ; DECOR (1967), il est possible que son extraction, et par suite sa diffusion dans le milieu au cours de la fermentation, ne puissent pas avoir lieu.

3° *Dès la fin de la fermentation* (tabl. 2 et 4), si le vin est laissé sur ses bourbes, on assiste à son enrichissement rapide et important en riboflavine. La levure, ayant terminé son activité fermentaire, rejette dans le milieu la majeure partie de la riboflavine qu'elle renferme. Dans le cas du *Listan* 1966, en l'espace de quatre jours, la teneur du vin en vitamine B_2 augmente de 120 µg par litre, soit de 85 p. 100.

4° *Après l'étape précédente*, le brassage des lies dans le vin, suivi de repos, ne provoque que de très faibles apports de riboflavine, les levures semblent être épuisées en ce corps et ne plus être capables d'une nouvelle libération (tabl. 3 et 4).

Au moment du premier soutirage, effectué 4 jours après la fin de la fermentation, la teneur des lies en riboflavine, exprimée par litre de vin, est faible par rapport à celle du vin lui-même, et elle est faiblement diminuée après leur agitation dans le vin (tabl. 6).

TABLEAU 6

Essais 1966
Lies des vins

Cépages	Lies des vins au premier soutirage, 4 jours après la fin de la fermentation			Lies des vins après agitation et 3 mois de repos
	Poids en g par litre de vin	Riboflavine en µg par 100 g	Riboflavine exprimée en µg/litre de vin	Riboflavine exprimée en µg/litre de vin
Listan	18,4	337	62	22
Aramon	18	388	70	60
Cinsault	18	500	90	70

5° *Conservation de la riboflavine dans les vins* après soutirage. Les dosages effectués dans les vins conservés quatre mois après avoir été séparés des bourbes, montrent que le vin conserve la vitamine B_2 qu'il renferme dans de bonnes proportions ; les pertes s'échelonnent entre 0 et 15 p. 100 (tabl. 3, colonne 6).

Tous les vins ayant été conservés à l'abri de la lumière, la différence de comportement entre les blancs et les rouges, constatée par certains auteurs, en particulier LAFOURCADE et PEYNAUD (1967), n'apparaît pas.

Il ressort de ces résultats, que la levure synthétise, au cours de son activité fermentaire, de la riboflavine, la rejette dans le jus en fermentation au fur et à mesure qu'elle l'élabore, puis s'épuise en ce corps pendant les quatre à six jours qui suivent la fin de la fermentation et devient ainsi incapable d'enrichir ultérieurement le vin terminé, au cours d'un brassage en son sein. Dans les meilleures conditions, un litre de vin peut fournir à l'homme 15 p. 100 de ses besoins quotidiens.

CONCLUSION

Cette étude nous renseigne sur le mécanisme d'enrichissement des vins en vitamine B_2 par la levure.

Cet enrichissement se produit tout au long de la fermentation alcoolique et se poursuit pendant le début de la garde des vins sur lies.

Ces résultats soulignent toute l'importance des levures en ce qui concerne la vitamine B_2 dans les vins, et l'intérêt qu'il y a à ne pas les séparer trop tôt du vin fini, ce qui a généralement lieu dans la pratique. En effet, à partir d'un raisin bien déterminé, on peut obtenir par un procédé naturel, un vin d'une teneur maximum et considérable en riboflavine, en provoquant quatre à six jours de contact levures-vins, dès la fin de la fermentation alcoolique.

Reçu pour publication en avril 1968.

SUMMARY

RIBOFLAVIN DURING FERMENTATION OF THE GRAPE JUICE, AND KEEPING OF THE WINE ON LEES

The riboflavin is determined during fermentation of the grape juice, in the fermenting lees, and in the wines as they are kept in contact with the lees after being agitated.

This study educed that the yeast synthesizes the riboflavin during its fermentative activity, rejects it into the fermenting juice as it produces it, and is then depleted into this form from four to six days after fermentation is completed, and becomes thus incapable of enriching the processed wine in the course of several stirrings.

RESUMEN

RIVOFLAVINA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL ZUMO DE UVA Y LA CONSERVACIÓN DEL VINO CON SUS HECES

Se determina la riboflavina durante el transcurso de la fermentación del zumo de uva, en las heces al final de la fermentación, y, acto seguido, en los vinos a medida que va transcurriendo su conservación en contacto con las heces, previa agitación.

De este estudio se deriva que : la levadura sintetiza la riboflavina durante el transcurso de su actividad de fermentación, la rechaza en el zumo en fermentación a medida que la va elaborante y, acto seguido, se agota en este cuerpo durante los cuatro a seis días que siguen el final de la fermentación y llega así a ser incapaz de enriquecer ulteriormente el vino terminado durante el transcurso de agitaciones sucesivas.

RASSIUNTO

RIBOFLAVINA DURANTE LA FERMENTAZIONE DEL MOSTO (SUCCO D'UVA) E LA CONSERVAZIONE DEL VINO SULLE FECCE

Si determina la riboflavina nel corso della fermentazione del succo dell'uva, nelle fecce alla fine dopo agitazione.

Risulta da questo studio che : il lievito sintetizza della riboflavina nel corso della sua attività fermentaria, la rigetta nel succo in fermentazione a misura che esso la elabora, poi si calma in questo corpo durante i quattro a sei giorni che seguono la fine della fermentazione e diviene cosí incapace d'arricchire ulteriormente il vino terminato nel corso d'agitazioni successive.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cailleau R., Chevillard L., 1949. Teneur de quelques vins français en aneurine, riboflavine, acide nicotinique et acide pantothénique. *Ann. agron.*, **19**, 277-281.

Castor J. G. B., 1953. The B complex vitamins of Musts and Wines as Microbiol growth factors. *Appl. Microbiol.*, **1**, 97-102.

Flavier H., 1939. Évolution des vitamines B_1 et B_2 au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 499-500.

Genevois L., Flavier H., 1938-1939. Dosages des vitamines B_1 et B_2 dans quelques vins de la Gironde. *P. V. Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux*, 72-73.

Hall A. P., Brinner L., Amerine M. A., Morgan A. F., 1956. The B vitamin content of grapes, musts and wines. *Food. Res.*, **21**, 362-371.

Lafourcade S., Peynaud E., 1957. Sur la teneur des vins en riboflavine. *Rev. Ferment. Industr. alim.*, **12**, 9-14.

Lodi M., 1943. D'après *Adv. Food Res.*, 1954, **5**, 460.

Morgan A. F., Nobles H. L., Wiens A., Marsh Gl., Winkler A. J., 1939. The B vitamins of California grape juice and wines. *Food Res.*, **4**, 217-229.

Ournac A., Flanzy M., 1967. Enrichissement en vitamine B_1 des vins conservés au contact des lies. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 41-54.

Ournac A., Decor M., 1967. Riboflavine dans le raisin au cours de sa croissance. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 309-320.

Perlman L., Morgan A. F., 1945. Stability of B vitamins in grape juices and wines. *Food Res.*, **10**, 334-341.

Poux C., Flanzy C., Flanzy M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 5-18.

Sisakian NM., Egorov I. A., Saakian R. G., 1950. D'après *Adv. Food Res.*, **5**, 460.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (1), 77-92.

ÉTUDE DE LA RESPIRATION RÉSIDUELLE DE CELLULES BROYÉES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN

C. BIZEAU

avec la collaboration technique d'Émilienne BIZEAU

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École nationale supérieure agronomique, 34 - Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Deux souches diploïdes de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN ne différant que par un couple de gènes respirent l'acide L-lactique selon des modalités différentes.

La respiration résiduelle de broyats obtenus avec des suspensions de ces deux souches a été étudiée. Il n'a pas été observé de différence entre les deux souches après broyage.

La respiration résiduelle des broyats représente 6 p. 100 de la respiration des suspensions. Le cycle de Krebs ne fonctionne plus dans les broyats et le facteur limitant la vitesse de respiration est constitué par les enzymes de la respiration terminale. On montre ainsi que la LLCR fonctionne différemment selon que l'accepteur ou le donateur d'électrons constitue le facteur limitant les réactions d'oxydo-réduction catalysées par cet enzyme.

INTRODUCTION

Les gènes de la série *pl* contrôlent la vitesse de croissance de la levure sur divers substrats non glucidiques. Ils modifient la morphologie coloniale sur les milieux gélosés où ces substrats constituent la seule source de carbone (P. GALZY, 1964 *a*), (P. GALZY, 1964 *b*).

Les gènes de la série *pl* peuvent être classés en plusieurs catégories, les uns conférant un avantage sélectif sur éthanol, d'autres sur acide lactique, d'autres encore sur des substrats divers. Chacun modifie probablement le métabolisme respiratoire à une étape différente.

Ce travail est une contribution à l'étude du gène pl_5.

Le gène pl_5 confère aux souches haploïdes qui le portent un avantage sélectif sur les milieux où l'acide lactique constitue la seule source de carbone.

Les deux souches utilisées, 4 et 183, sont deux souches diploïdes isogéniques sauf pour la paire de gènes considérée. La souche 4 est PL_5PL_5, la souche 183 est pl_5pl_5.

Ces deux souches présentent un certain nombre de différences morphologiques. Le volume des cellules est en moyenne double pour 4 de ce qu'il est pour 183 (Bizeau et Galzy, 1966) ; les colonies obtenues sur milieu solide à base d'acide lactique ou d'éthanol sont lisses pour la souche 183, plissées pour la souche 4.

La seule différence au niveau du métabolisme de l'acide L-lactique semble porter sur les variations de la vitesse de respiration en fonction de la concentration en acide L-lactique (Galzy 1964 *a*). Pour la souche 4, la constante de demi-saturation du système respiratoire de la cellule intacte pour l'acide L-lactique est de 0,4 mM, les mesures étant faites à pH = 4,5. Pour la souche 183 le système respiratoire est déjà saturé pour une concentration de 0,04 mM. Aucune différence n'a été trouvée par ailleurs quant aux propriétés des enzymes impliquées dans ce système respiratoire.

En résumé, le gène pl_5 a une action pléiotrope et il est probable qu'il agit sur le métabolisme de l'acide L-lactique, non pas en réglant la synthèse d'un enzyme mais en en modifiant le fonctionnement dans la cellule.

Ce serait un gène régulateur d'un type nouveau.

L'étude de ce gène est limitée chez la cellule intacte par l'existence de barrières de perméabilité et par la complexité des circuits métaboliques étudiés, mais par ailleurs aucune différence n'a pu être décelée au niveau enzymatique entre les deux souches. La préparation de fractions subcellulaires peut permettre de pousser cette étude plus avant.

La première étape est l'expérimentation sur des cellules broyées.

Ce sont les résultats de cette expérimentation qui sont exposés dans cet article.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. *Matériel biologique*

Le matériel biologique comprend les souches 4 et 183 (Galzy, 1964 *a*).

Les souches *4 pc* subclone et *183 pc* ont été utilisées également. *4 pc* et *183 pc* sont des mutants à déficience respiratoire (petites végétatives) isolées respectivement dans des cultures de 4 et 183 traitées à l'acriflavine (Galzy, 1964 *a*). *4 pc* subclone provient d'une colonie prélevée dans un étalement de *4 pc* sur milieu solide.

2. *Cultures*

Les souches sont conservées en stock sur milieu gélosé contenant : extrait de levure, 0,5 p. 100 glucose 0,5 p. 100.

Les cultures sont menées à la température du laboratoire en ballons de 6 l contenant 1,2 l de milieu liquide et agitées constamment sur un agitateur New Brunswick (amplitude 8 cm-96 période par minute).

ABRÉVIATIONS

LLCR : L-lacticocytochrome C réductase (1. 1. 2. 3.).
Cyt C : Cytochrome C
NADH : Diphosphopyridine nucléotide réduit.
QR : Quotient respiratoire.

Elles sont obtenues à partir d'un inoculum de 100 ml du même milieu.

Le milieu utilisé est à base d'extrait de levure Difco 0,5 p. 100 amené à pH 4,5 par de l'acide tartrique 10 p. 100.

On y ajoute en même temps que l'inoculum, soit 100 ml d'éthanol 10 p. 100 stérile, soit 100 ml de glucose stérile à des concentrations variant de 20 p. 100 à 5 p. 100. La nature du milieu de culture sera indiquée dans le texte pour chaque expérience.

3. *Fabrication des broyats*

La culture est prélevée en fin de phase exponentielle, centrifugée à 755 *g*, 5 minutes, dans une centrifugeuse réfrigérée. A partir de ce stade le matériel biologique est maintenu au voisinage de 0° jusqu'au moment des mesures.

Le culot est lavé une fois au tampon phosphate pH 5,8 puis transféré dans un mortier avec 2 à 3 ml de tampon.

On ajoute 50 g de billes de verre (Bellotini n° 18) et on broie à la main 30 minutes en refroidissant.

Le broyat est centrifugé (755 *g*) 5 minutes, lavé 2 fois par 2 à 3 ml de tampon pH 5,8 et amené à 15 ml à l'aide du même tampon.

Le pH 5,8 a été choisi pour le broyage car il correspond au pH interne de la cellule (KOTYK, 1963). Le broyat obtenu est au même pH.

4. *Fractionnement*

Le broyat ainsi obtenu constitue le « Broyat Brut ».

Une centrifugation à 1 475 *g* pendant 10 minutes permet de séparer un culot appelé *1 475 C* qui renferme des cellules intactes, des cellules endommagées, des parois, et un surnageant *1 475 S*.

5. *Dosages et mesures diverses*

Les protéines des divers échantillons sont dosées par la méthode du biuret selon STRICKLAND (1951).

Le nombre de cellules présentes dans ces échantillons est estimé par numération à l'hématimètre de Thoma, la proportion de cellules vivantes par dénombrement des colonies poussées sur milieu solide ensemencé après dilution préalable.

Les mesures de respiration sont effectuées soit selon la méthode de Warburg, soit avec un oxygraphe Gilson. La méthode de mesure utilisée est indiquée dans le texte pour chaque série d'expérience.

Les mesures au Warburg sont faites en tampon phosphate à pH 5,8, les mesures à l'oxygraphe en tampon *Tris*-citrate à pH 5,8.

Le L-lactate de potassium à pH 5,8 est obtenu selon M. SOMLO (1965) à partir de L-lactate de calcium Calbiochem. Ce L-lactate contient environ 2 p. 100 de D-lactate.

Les solutions d'acide D-lactique sont obtenues par la même méthode à partir de D-lactate de calcium de même origine.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. *Caractéristiques des broyats*

Les broyats obtenus par centrifugation à 755 *g* ou « Broyats Bruts » sont constitués d'une part de suc cellulaire contenant en suspension des particules infracellulaires et d'autre part des éléments figurés qui sont des cellules plus ou moins abîmées. La plupart de ces cellules sont mortes ; cependant, à chaque expérience, le Broyat Brut contient une proportion variable de cellules susceptibles de se multiplier.

Ce sont ces cellules mortes ou vivantes qui sont éliminées par la centrifugation à 1 475 *g*.

Le tableau 1 donne pour un certain nombre d'expériences le pourcentage des cellules survivantes dans le Broyat Brut. Chaque ligne du tableau correspond à une expérience. Pour obtenir les chiffres de la dernière colonne, la quantité de protéines correspondant aux cellules contenues dans le broyat a été calculée sur la base de

TABLEAU I

Constitution des broyats bruts

Souche	Protéines du broyat brut (mg)	Cellules dénombrées à l'hématimètre ($\times 10^{-8}$)	Quantité de cellules capables de multiplier	
			en p. 100 des cellules dénombrées	en protéines exprimées en p. 100 des protéines du broyat brut
183	33	24	13	2,25
	28	32	—	—
	39	18	0,3	0,03
	23	7	10	0,7
	33	10	8	0,56
4	86	7	13	0,49
	11	4	—	—
	12	38	0,02	0,003
	13	9	22	0,7
	11	4	9,5	0,15
	22	32	9,5	0,05

0,46 mg pour 106 · 10^6 cellules dans le cas de la souche 4, et pour 207 · 10^6 cellules dans le cas de la souche 183.

Le tableau 2 donne le rendement du broyage et la répartition du matériel entre

TABLEAU 2

Rendement des broyages

Souche	Protéines récupérées dans le broyat en p. 100 des protéines totales de la culture			Protéines dans la fraction 1475 S, en p. 100 des protéines du broyat brut		
	Moyenne	Limites	Nombre de déterminations	Moyenne	Limites	Nombre de déterminations
4	30	12/38	7	89	88/91	5
183	30	8/50	5	83	77/90	5

les fractions *1475 S* et *1475 C* durant la purification du Broyat. Les expériences dont les résultats ont été utilisés pour ces deux tableaux ont été effectués avec des levures cultivées sur éthanol.

Le rendement du broyage est de 60 à 80 p. 100 pour les deux souches. Le taux d'extraction des protéines dans le broyat brut est identique pour les deux souches.

La fraction *1475 C* est peut-être un tout petit peu plus importante pour la souche 183. Elle est formée de parois glucidiques et de cellules plus ou moins abîmées. Cette différence est peut-être en rapport avec la différence de taille des cellules de 4 et de 183. Lorsqu'elles sont cultivées dans ces conditions, les cellules de 183 sont plus petites. Elles peuvent être un peu plus résistantes au broyage. La fraction constituée par les parois glucidiques doit être également un peu plus importante.

2. *Coefficients métaboliques*

A) *Répartition des enzymes respiratoires entre les deux fractions* 1475 C *et* 1475 S.

Comme nous le verrons plus loin la respiration de l'acide L-lactique par les deux fractions du broyat est limitée par la respiration terminale. La mesure de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique à la concentration 240 mM permet d'estimer la concentration de l'échantillon considéré en enzymes respiratoires « fonctionnels ».

Le tableau 3 donne le pourcentage d'activité respiratoire dans la fraction *1475 C* par rapport au broyat brut.

TABLEAU 3

Répartition des protéines totales et de l'activité respiratoire entre les deux fractions du broyat

Le tableau indique les pourcentages des protéines totales et des enzymes respiratoires du broyat brut qui se retrouvent dans la fraction *1 475 C*

Souche	Protéines p. 100 du broyat brut		Pouvoir respiratoire p. 100 du broyat brut		Nombre de déterminations
	Moyenne	Limites	Moyenne	Limites	
4	10,4	4-15	20	13-23	6
183	13,2	7-20	27	10-41	4

La fraction *1475 C* a en apparence un pouvoir respiratoire supérieur à celui du broyat total. En effet elle recueille environ 10 p. 100 des protéines totales et 20 p. 100 de l'activité respiratoire. Elle a donc une activité respiratoire ramenée au mg de protéines double de celle de la fraction *1475 S*. Cependant il faut tenir compte, dans l'interprétation des résultats, de la présence de cellules vivantes. Celles-ci peuvent rendre compte de 7 p. 100 de la respiration du broyat brut dans le cas de la souche 4 et de 10 p. 100 dans le cas de la souche 183 (moyennes de 3 expériences, ces chiffres ont été établis d'après les calculs décrits dans le paragraphe suivant). Ces cellules intactes se retrouvent entièrement dans la fraction *1475 C* et rendent compte d'une grande

partie de son activité respiratoire. Dans ces conditions il n'y a pas de différence dans la répartition des enzymes respiratoires entre les deux fractions du broyat chez les deux souches.

B) *Loi d'action de la concentration en acide L-lactique sur la vitesse de respiration.*

a) *Broyats bruts.*

La vitesse de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration en substrat a été mesurée pour 12 broyats obtenus à partir de 12 cultures sur éthanol 1 p. 100.

Les résultats des mesures sont données par les figures 1 A, 1 B et 1 C.

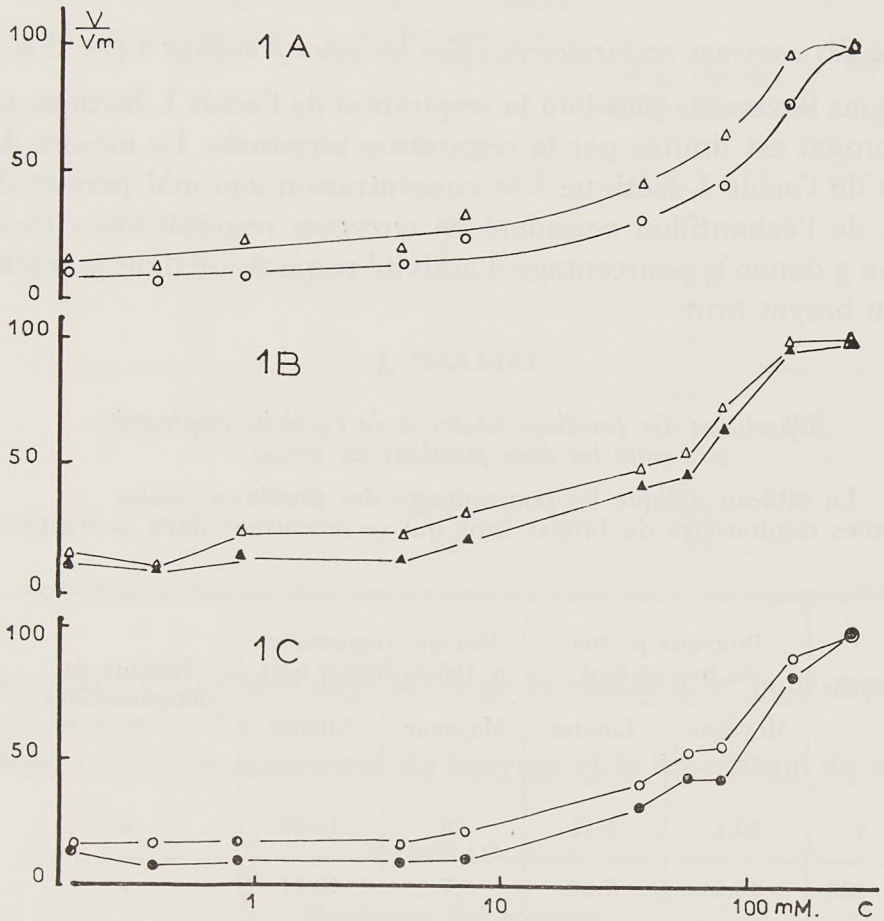


FIG. 1. — *Variation des vitesses de respiration de l'acide L-lactique par les broyats bruts en fonction de la concentration*

abscisses : concentration en acide L-lactique mM
ordonnées : vitesse relative de la respiration
○ Souche 4 vitesse non corrigée pour la respiration des cellules intactes
△ Souche 183 vitesse non corrigée pour la respiration des cellules intactes
● Souche 4 vitesse corrigée pour la respiration des cellules intactes
▲ Souche 183 vitesse corrigée pour la respiration des cellules intactes

La vitesse nette de respiration après soustraction de l'activité due au broyat en absence de substrat est exprimée en pourcentage de la vitesse obtenue pour la plus forte concentration en acide L-lactique ayant pu être utilisée. La saturation du système respiratoire n'a peut-être pas été atteinte dans ces expériences.

La figure 1 A donne les résultats moyens des 12 expériences (6 expériences pour la souche 183 et 6 expériences pour la souche 4).

Les figures 1 B et 1 C correspondent chacune à 3 de ces expériences. Pour ces dernières il a été fait des mesures permettant d'estimer approximativement la part revenant aux cellules vivantes dans la respiration du broyat.

Le principe du calcul de la correction à effectuer est le suivant : la vitesse de respiration de la suspension de levure utilisée à la fabrication d'un broyat est mesurée à la concentration 76 mM. Le nombre de cellules vivantes est estimé par étalement du broyat sur milieu solide après dilution préalable. Connaissant l'absorption d'oxygène ramenée au mg de protéine de la suspension à la concentration 76 mM, on en déduit l'absorption aux autres concentrations utilisées. La cinétique de la respiration de l'acide L-lactique par les cellules intactes à pH 5,8 a été étudiée par ailleurs (Bizeau, Galzy et Vezinhet, 1966). On peut ainsi retrancher de la respiration du broyat la part approximative revenant aux cellules vivantes qu'il contient.

Sur la figure 1 A une légère différence semble exister entre les deux souches. Cependant elle peut être due uniquement à la présence de levures intactes dans les broyats. Cette correction n'est pas en effet négligeable comme le montrent les figures 1 B et 1 C.

b) *Fraction* 1475 S.

La loi d'action de la respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration en substrat a été établie comme dans le cas des broyats bruts. Il n'y a pas ici de correction à faire pour tenir compte des levures vivantes. La figure 2 donne

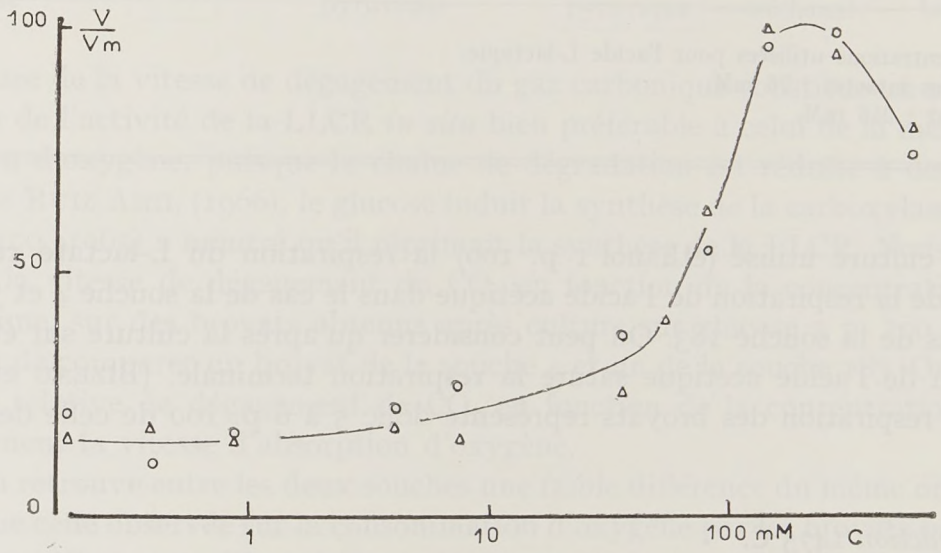


Fig. 2. — *Variation des vitesses de respiration de l'acide L-lactique par la fraction* 1475 *S en fonction de la concentration*
abscisses : concentration en acide L-lactique mM
ordonnées : vitesse relative de la respiration
○ Souche 4 △ Souche 183

pour 4 et 183 les courbes correspondantes. Chaque courbe représente la moyenne de 5 expériences. Les deux courbes sont rigoureusement identiques aux erreurs d'expérience près. Le maximum de la respiration est atteint pour la concentration 150 mM.

La courbe ne reproduit pas du tout le fonctionnement de la LLCR, mais la LLCR n'est plus dans ces conditions le facteur limitant la respiration. En effet la respiration résiduelle de l'acide L-lactique par les broyats correspond au 1/10 de l'activité LLCR des broyats. Il en est de même pour le broyat brut et la fraction *1475 C*.

Les Q_{O_2} L-lactate de la fraction *1475 S* sont en moyenne de 6,5 (tabl. 4). Les cellules qui ont servi à la confection de ces broyats avaient des Q_{O_2} L-lactate de 42 pour la souche 4 et de 65 pour la souche 183 (moyenne de 3 expériences). Sur le

TABLEAU 4

QO_2 moyens des broyats obtenus avec les souches 4, 183, 4 pc, et 183 pc

(Q_{O_2} calculés sur 0-30 minutes et corrigés pour la respiration des substrats endogènes
Les 4 chiffres du tableau présentent la moyenne des résultats de plusieurs expériences indépendantes.
Le nombre de ces expériences est indiqué entre parenthèse)

Préparation	Broyat brut	1475 S	Broyat brut	1475 S	Cellules intactes	Cellules intactes	Broyat	Broyat
Souches	4	4	183	183	4 *pc* subclone	183 *pc*	4 *pc* subclone	183 *pc*
L lactate *xx*	8,6 (8)	6,9 (6)	6,8 (8)	6,5 (6)	2,4 (5)	0,8 (5)	1,4 (5)	1,5 (5)
Glucose 2, 7 mM	— —	— —	— —	— —	3,5 (4)	3,8 (4)	0,5 (3)	1,2 (2)

xx Concentrations utilisées pour l'acide L-lactique.
— cellules intactes : 76 mM.
— broyat : 245 mM.

milieu de culture utilisé (éthanol 1 p. 100) la respiration du L-lactate représente 45 p. 100 de la respiration de l'acide acétique dans le cas de la souche 4 et 52 p. 100 dans le cas de la souche 183. On peut considérer qu'après la culture sur éthanol la respiration de l'acide acétique sature la respiration terminale. (Bizeau et Galzy, 1965). La respiration des broyats représente donc 5 à 6 p. 100 de celle des cellules intactes.

c) *Fraction* 1475 C.

La loi d'action de la concentration en acide L-lactique sur la vitesse de respiration a été faite avec la fraction éliminée du broyat lors de la purification.

Ces mesures ont été faites à l'oxygraphe. La courbe obtenue avec cette fraction est très semblable à celle obtenue avec le broyat brut. La moyenne des vitesses relatives obtenues pour 183 est à la plupart des concentrations utilisées supérieure à la même moyenne obtenue avec la souche 4. Les résultats ne peuvent cependant être considérés comme significativement différents.

C) *Étude du dégagement de gaz carbonique en fonction de la concentration en acide L-lactique.*

a) Mesure avec des broyats bruts de 4 et 183.

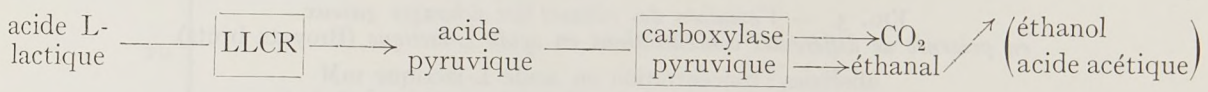
L'acide L-lactique est respiré par les levures avec un QR = 1 (Galzy, 1964 *a*). Un certain nombre de mesures préliminaires ont montré qu'il n'en était plus ainsi avec les broyats. Le contrôle métabolique est alors différent.

Théoriquement on peut envisager deux voies pour la dégradation de l'acide L-lactique. L'une passe par l'oxydase pyruvique et le cycle de Krebs, c'est la voie qui est considérée comme la plus vraisemblable pour la cellule intacte. L'autre, passant par la carboxylase pyruvique, parviendrait à l'éthanal et peut-être à l'éthanol ou à l'acide acétique. Cette voie purement hypothétique, improbable dans la cellule intacte, semble tout à fait possible dans les broyats où on enregistre généralement des dégagements de gaz carbonique très abondants et où on note quelquefois la formation de quantité notable d'éthanal pendant la dégradation de l'acide L- et D-lactique et de l'acide pyruvique.

Dans les mêmes conditions l'absorption d'oxygène est beaucoup plus faible et très souvent nulle dans le cas de l'acide pyruvique.

C'est ce que montre le tableau 5, établi avec les résultats de 4 expériences effectuées sur des suspensions cultivées sur éthanol 1 p. 100.

Galzy (1964 *a*) a montré par ailleurs que chez les mutants à déficience respiratoire, l'acide lactique était dégradé en composé à deux carbones, pourvu que la cellule ait à sa disposition en même temps un substrat fermentescible. Si la voie principale de dégradation de l'acide L-lactique dans les broyats est :



la mesure de la vitesse de dégagement du gaz carbonique constitue un moyen d'évaluation de l'activité de la LLCR *in situ* bien préférable à celui de la mesure de l'absorption d'oxygène, puisque la chaîne de dégradation est réduite à deux enzymes. D'après Ruiz Amil (1966), le glucose induit la synthèse de la carboxylase pyruvique. M. Somlo (1965) a montré qu'il réprimait la synthèse de la LLCR. Nous avons donc étudié la vitesse de dégagement du CO_2 en fonction de la concentration en acide L-lactique, sur des broyats obtenus après culture sur glucose 2 p. 100. La figure 3 permet de comparer un broyat de la souche 4 et un de la souche 183. On voit que la vitesse relative de dégagement de CO_2 en fonction de la concentration suit assez exactement la vitesse d'absorption d'oxygène.

On retrouve entre les deux souches une faible différence du même ordre de grandeur que celle observée sur la consommation d'oxygène par les broyats bruts obtenus avec des cultures sur éthanol (fig. 1 A). Dans ces deux expériences les QR bruts ont été respectivement de 1,5 pour la souche 4 et de 1,2 pour la souche 183. Les QR bruts sont les QR calculés avec les consommations d'oxygène et les dégagements de gaz carbonique sans correction pour l'activité due à l'oxydation ou à la fermentation spontanée du broyat. Les QR nets au contraire sont en moyenne de 3 pour la souche 4 et de 2 pour la souche 183. Ces résultats ont été retrouvés avec des cultures de 4 et de 183 sur glucose 1 p. 100 et sur éthanol 1 p. 100. Il arrive avec ces broyats que le

QR du broyat sans substrat soit supérieur à 1. Il arrive même quelquefois dans le cas des cultures sur éthanol que le dégagement « endogène » de gaz carbonique soit beaucoup plus abondant que celui obtenu avec l'acide L-lactique aux plus faibles concentrations. Il est possible que certains de ces broyats soient le siège d'une fermentation spontanée qui peut être inhibée par la présence du substrat. Ce phénomène interfère avec les résultats des mesures sur l'acide L-lactique mais n'en modifie pas l'interprétation : même dans ce cas, la vitesse de dégagement de CO_2 en présence d'acide L-lactique varie comme la consommation d'oxygène. Seul est modifié le QR calculé sur les valeurs nettes de dégagement de CO_2 ou d'absorption de O_2.

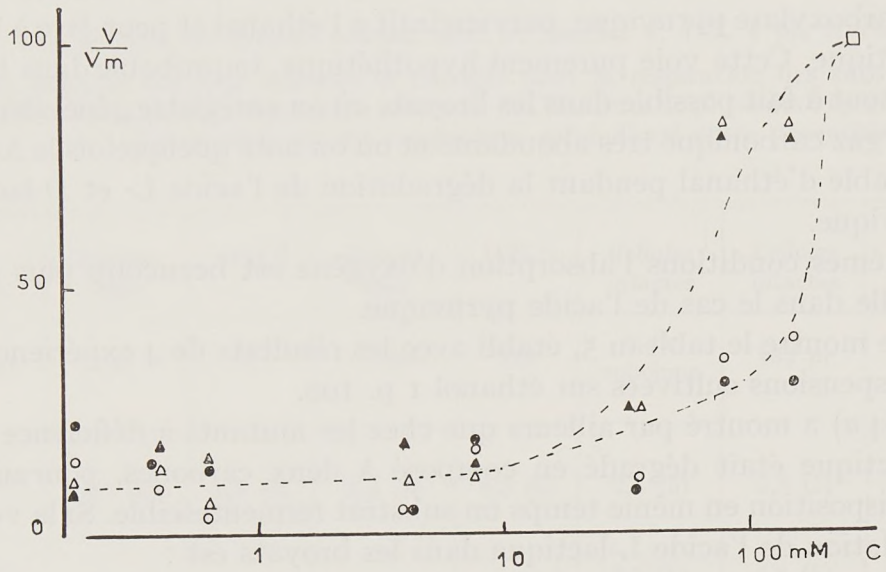


Fig. 3. — *Variation des vitesses des échanges gazeux en présence de différentes concentrations en acide L-lactique* (Broyats bruts)

abscisses : concentration en acide L-lactique mM
ordonnées : vitesse relative des échanges respiratoires
○ Souche 4 vitesse d'absorption de l'oxygène
△ Souche 183 vitesse d'absorption de l'oxygène
● Souche 4 vitesse de dégagement du gaz carbonique
▲ Souche 183 vitesse de dégagement du gaz carbonique

Il n'a pas été fait de véritable bilan d'oxydation mais à chaque fois que l'on a pu considérer l'oxydation de l'acide L-lactique par le broyat comme terminée, les quantités d'oxygène consommées et de gaz carbonique dégagées étaient cohérentes avec l'hypothèse d'une transformation de l'acide L-lactique en éthanal (consommation d'oxygène inférieure ou égale à 11,2 µl pour une µ mole d'acide lactique fourni).

b) *Mesure avec des levures à déficience respiratoire.*

Ephrussi et coll. (1949 *a* et *b*) ont décrit des mutants qui ont perdu la faculté de pousser sur des substrats non fermentescibles. Ces mutants « petites colonies » ont perdu les enzymes de la respiration terminale. Ils sont dépourvus de toute activité cytochrome-oxydase, NADH-cyt. C réductase, succino-cyt. C réductase, et α glycérophosphate-cyt. C réductase, ils ont conservé les lactico réductases. Cependant Roodyn et Wilkie (1967) ont observé chez 8 de ces mutants une forte diminution de l'activité LLCR. Ils ont conservé également une faible respiration due à la persistance de la cyt. C péroxydase (Slonimski, 1953). Cette respiration qui assure un Qo_2 glucose

d'environ 3, variant peu avec les conditions de culture, est inefficace pour la levure. L'étude de cette respiration, dans la mesure où elle est possible, est importante pour la comparaison de 4 et de 183. Elle devrait permettre d'étudier le système LLCR-cyt. C peroxydase. Une différence éventuelle dans le fonctionnement de ce système éliminerait définitivement l'hypothèse selon laquelle la différence entre ces deux souches proviendrait du fonctionnement de la respiration terminale au-delà du cytochrome C.

Il faut noter que les souches « 183 pc » et « 4 pc subclone » expriment, sur certains milieux de culture, le phénotype lisse ou plissé correspondant à leur génotype (P. Galzy et *al.* (1967).

Des cultures de « 4 pc subclone » et de « 183 pc » ont été obtenues sur glucose 2 p. 100 et broyées comme il a été décrit précédemment. La loi d'action de la concentration en acide L-lactique sur la vitesse de dégagement du gaz carbonique est donnée par la figure 4. Les points de la figure représentent la moyenne de deux expériences. Les courbes obtenues sont assez semblables à celles obtenues avec 4 et 183. Il n'y a pas de différence entre les deux souches. L'examen des vitesses de respiration montre que celles-ci baissent légèrement pour « 4 pc » pendant le deuxième quart d'heure d'expérience. Pendant ce même temps, celles de « 183 pc » s'annulent généralement, cependant que le dégagement de gaz carbonique peut se poursuivre.

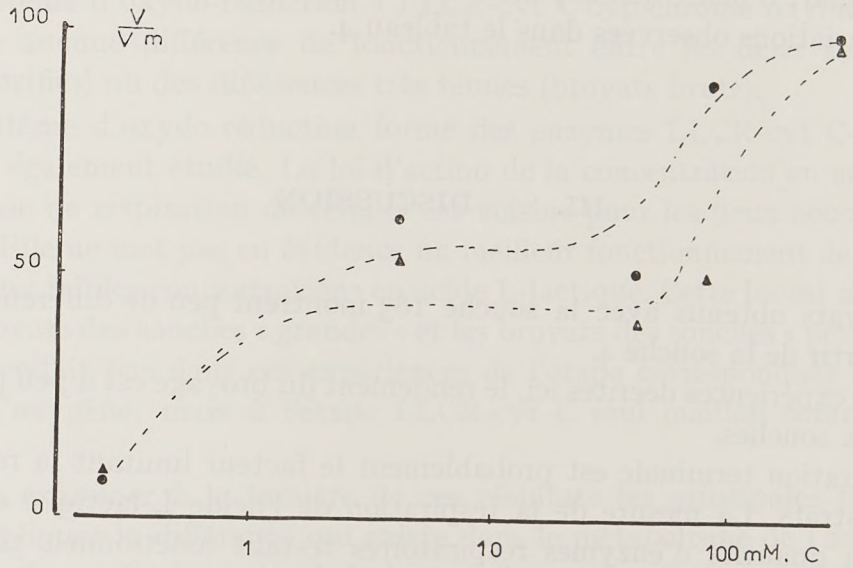


Fig. 4. — *Variation des vitesses des échanges gazeux en fonction de la concentration en acide L-lactique chez les mutants « petites colonies »*

(Broyats bruts)
abscisses : concentration en acide L-lactique mM
ordonnées : vitesse relative des échanges respiratoires
● Souche « 4*pc* subclone » : vitesse de dégagement du gaz carbonique
▲ Souche « 183 *pc* » : vitesse de dégagement du gaz carbonique

Il n'est donc pas certain que les points expérimentaux correspondant à la respiration de la souche « 183 pc » mesurent réellement une vitesse ; ils peuvent tout aussi bien mesurer l'importance d'un facteur limitant inconnu.

La ressemblance entre les courbes obtenues pour 4 et pour « 4 pc » conduit à se demander si les chaînes d'oxydation étudiées ne seraient pas les mêmes et si le broyage n'aurait pas complètement détruit chez 4 la voie passant par la cytochrome oxydase.

Un certain nombre de comparaisons permises par le tableau 4 montrent qu'il n'en est rien. Les Qo_2 maximum permis par la cyt C peroxydase sont en moyenne de 3,6 pour les deux souches « 4 pc » et « 183 pc ». Le broyage détruit une partie importante de cette voie métabolique, si bien que les Qo_2 L-lactate des broyats des petites colonies sont nettement plus faibles que ceux des grandes colonies. Il est peu probable que la voie respiratoire passant par la cytochrome oxydase représente la fraction la plus importante de la respiration des broyats des souches « grandes colonies ».

Le tableau 4 permet de faire une autre remarque. Si les cellules intactes de « 183 pc » et de « 4 pc subclone » peuvent respirer le glucose à la même vitesse, « 183 pc » respire moins bien l'acide L-lactique que « 4 pc subclone ». La probabilité pour que la différence entre les Qo_2 L-lactate moyens de « 183 pc » et de « 4 pc subclone » soit due aux erreurs expérimentales est inférieure à 0,05.

Cette différence ne se retouve plus sur les broyats. Il semble même que les Qo_2 L-lactate des broyats de « 183 pc » soient plus élevés que les Qo_2 L-lactate des cellules intactes de la même souche ; ceci pourrait s'expliquer par une différence de perméabilité de la membrane cellulaire entre « 4 pc subclone » et « 183 pc ». Cependant la différence entre les Qo_2 L-lactate des broyats et des cellules intactes de « 183 pc » n'est pas significative ($0{,}20 < P < 0{,}30$).

D'autre part les Qo_2 des broyats de « 183 pc » sont le plus souvent nuls pendant le deuxième quart d'heure de l'expérience. Il est donc difficile de proposer une explication aux variations observées dans le tableau 4.

III. — DISCUSSION

Les broyats obtenus avec la souche 183 montrent peu de différence avec ceux obtenus à partir de la souche 4.

Dans les expériences décrites ici, le rendement du broyage est à peu près le même pour les deux souches.

La respiration terminale est probablement le facteur limitant la respiration de tous les substrats. La mesure de la respiration de l'acide L-lactique est donc une mesure de la quantité d'enzymes respiratoires restant fonctionnels pour les deux souches.

Les Qo_2 acide L-lactique sont égaux pour les deux souches. Ils représentent environ 6 p. 100 du pouvoir respiratoire maximum des suspensions ayant servi à confectionner les broyats. La répartition des enzymes respiratoires dans les deux fractions du broyat est comparable pour les deux souches.

Le contrôle de la respiration de l'acide L-lactique est différent dans les broyats et dans la cellule intacte. Dans les broyats la vitesse de respiration est limitée par la respiration terminale. En outre, le cycle de Krebs est peu ou pas fonctionnel : la respiration de l'acide L-lactique s'arrête au stade éthanal ou acide acétique. Pour les cellules intactes, la courbe des vitesses de respiration établie à pH 4,5 en fonction de la concentration en acide L-lactique, est semblable chez la souche sauvage à la courbe des vitesses de fonctionnement de la LLCR en présence de ferricyanure ou de cytochrome C.

Ceci n'est plus vrai pour le broyat ni pour les vitesses d'absorption d'oxygène qui mesurent le fonctionnement de l'ensemble LLCR-cyt C-cytochrome oxydase, ni pour les vitesses de dégagement de CO_2 qui mesurent le fonctionnement de l'ensemble LLCR-décarboxylase pyruvique. Dans ce dernier système, la LLCR étant e facteur limitant, la vitesse de dégagement du CO_2 mesure la vitesse de transformation de l'acide L-lactique en acide pyruvique.

Le fonctionnement de la LLCR est donc sous la dépendance du système qui transmet les électrons jusqu'à l'oxygène de l'air, et c'est ce système qui impose à la LLCR la cinétique que nous avons décrite à travers les courbes des figures 1, 2 et 3. Lorsque l'accepteur d'électrons de la LLCR est le ferricyanure ou du cytochrome C exogène en quantité non limitante, le système d'oxydo-réduction ainsi formé a des propriétés identiques pour les deux souches (Galzy, 1964).

Le caractère particulier des enzymes d'oxydo-réduction comme la LLCR réside dans le fait qu'il leur faut obligatoirement deux substrats pour fonctionner, un donateur d'électrons (l'acide L-lactique) et un récepteur (le cytochrome C). Cette particularité influe sur la régulation de la synthèse de ces enzymes (Slonimski, 1953). On peut voir ici qu'elle influe également sur la régulation de leur fonctionnement. Celui-ci peut être limité à l'une ou à l'autre des deux étapes : oxydation du L-lactate et réduction du cytochrome C.

Le système d'oxydo-réduction « LLCR-cyt C-cytochrome oxydase », étudié ici ne montre aucune différence de fonctionnement entre les deux souches étudiées (broyats purifiés) ou des différences très ténues (broyats bruts).

Le système d'oxydo-réduction formé des enzymes LLCR-cyt C-cyt C peroxydase, a été également étudié. La loi d'action de la concentration en acide L-lactique sur la vitesse de respiration de celui-ci est voisine pour les deux souches « 4 pc » et « 183 pc ». Elle ne met pas en évidence un meilleur fonctionnement de la LLCR chez 183 pc » aux faibles concentrations en acide L-lactique. Cette loi est assez semblable pour les broyats des souches « grandes » et les broyats des souches « petites » comme si elle ne dépendait pas dans ces expériences de l'étape correspondant à la réduction finale de l'oxygène, mais à l'étape LLCR-cyt C seul maillon commun aux deux chaînes.

Il faut examiner à la lumière de ces résultats les principales hypothèses qui peuvent expliquer la différence qui existe dans le métabolisme de l'acide L-lactique pour les souches 4 et 183, à savoir le fait que la souche 183 respire l'acide L-lactique beaucoup plus vite que la souche 4 aux faibles concentrations.

On peut expliquer ce phénomène :

1° par une modification du mécanisme de transport de l'acide L-lactique au niveau de la membrane cytoplasmique ;

2° par une modification du fonctionnement de la chaîne respiratoire.

La première hypothèse ne peut dans l'état actuel de nos connaissances être rejetée et elle suffirait à expliquer la disparition de la différence entre les souches pendant le broyage. Elle expliquerait en partie certains résultats du tableau 4. Cependant si les résultats de ce mémoire n'apportent rien contre elle, des résultats antérieurs semblent montrer que les deux isomères de l'acide lactique rentrent par la même voie chez les deux souches. Galzy 1964 *c*, a mis ceci en évidence par l'emploi d'acide lactique marqué au Carbone 14. L'étude de l'action du pH sur la respi-

ration des cellules intactes (BIZEAU, GALZY et VEZINHET, 1966) l'a confirmé. Il est donc peu probable que la mutation $PL_5 \rightarrow pl_5$ ait modifié le système d'entrée de l'acide L-lactique.

Si l'on envisage maintenant la deuxième hypothèse, on remarque que la différence entre les deux souches a disparu alors que le cycle de Krebs cessait pratiquement de fonctionner. Il est peu probable pourtant qu'une mutation, modifiant le métabolisme de la levure à cette étape, confère au mutant une meilleure vitesse de respiration sur le seul substrat acide lactique.

TABLEAU 5

Respiration de divers substrats par des broyats bruts
(Valeurs non corrigées pour la respiration des substrats endogènes, calculées sur les 30 premières minutes de mesure. Chaque ligne du tableau correspond à une expérience)

	Acide L-lactique 150 mM			Acide D-lactique 150 mM			Acide pyruvique 150 mM		
	Qo_2	$Q\ co_2$	QR	Qo_2	$Q\ co_2$	QR	Qo_2	$Q\ co_2$	QR
Souche 183	18,5	33	1,8	25	35	1,4	10	149	15
	8,3	15,7	1,9	8	16	2,0	0	244	—
Souche 4	9,2	22,5	2,4	8	15,5	1,9	1,2	143	120
	8,9	21,9	2,4	11	23,9	2,1	0	445	—

La différence dans le fonctionnement de la chaîne d'oxydation peut se situer au niveau du cytochrome C ou de la cytochrome oxydase. Cette étape de la respiration est le facteur limitant les vitesses de respiration dans les expériences décrites ici. Pour la fraction *1475 S* aucune différence n'existe entre ce qui subsiste de la chaîne des cytochromes dans les broyats de 4 et ce qui en subsiste dans les broyats de 183. Pour les broyats bruts les résultats sont plus douteux. On doit envisager l'éventualité selon laquelle, une grande partie de l'activité respiratoire ayant été perdue au cours du broyage, c'est la partie responsable de la différence qui aurait été perdue. On peut penser également que la désorganisation consécutive au broyage est responsable à la fois de la diminution des Qo_2 et de la disparition de la différence existant entre 4 et 183 sans qu'il y ait eu nécessairement perte d'un enzyme.

CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales utilisées ici, il est possible de préparer des broyats dont la respiration représente environ 6 p. 100 de celle des suspensions de départ.

La respiration de l'acide L-lactique par des préparations de ce type met en évidence l'arrêt de fonctionnement du cycle de Krebs et la transformation en éthanal ou en éthanol de l'acide L-lactique.

Pour ce substrat, la voie de dégradation est formée de la LLCR et de la décarboxylase pyruvique. La chaîne de transport des électrons à l'oxygène de l'air comprend la LLCR, le cyt C, et la cytochrome oxydase. Le facteur limitant la vitesse des réactions est la LLCR dans le premier cas, le cytochrome C ou la cytochrome oxydase dans le second.

La même étude a été faite avec des mutants à déficience respiratoire. La voie de dégradation de l'acide L-lactique est probablement la même. Dans la chaîne de transport des électrons du substrat à l'oxygène de l'air, la cyt C peroxydase a remplacé la cytochrome oxydase dont ces mutants sont dépourvus. Les résultats montrent le caractère particulier de la LLCR enzyme d'oxydo-réduction. Elle a obligatoirement deux substrats, un donateur et un accepteur d'électrons. Elle fonctionne différemment selon que l'une ou l'autre de ces deux réactions, oxydation de l'acide L-lactique et réduction du cyt-,C, se trouve être le facteur limitant de la réduction globale.

Le fonctionnement de ces divers systèmes enzymatiques dans les broyats ne semble pas modifié par la mutation $PL_5 \rightarrow pl_5$.

Reçu pour publication en mars 1968.

SUMMARY

INVESTIGATING THE RESIDUAL RESPIRATION OF CRUSHED CELLS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE HANSEN

The residual respiration of the crushed matter of two strains of *Saccharomyces cerevisiar* HANSEN differing but by a pair of genes is set forth herein.

Such respiration amounts to approximately 6 p. 100 of that of the initial suspensions. The Krebs cycle is no longer operative in the crushed matter. The pyruvic acid is virtually not oxidized but releases carbon dioxide profusely. The L- and D-lactic acids, converted into pyruvic acid by the lactic-cytochrome C reductases, degenerate in the same way, their final oxidation being a two-carbon compound, probably ethanol.

The two strains used show differences in the L-lactic acid respiration, differences crushing them does away with.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA RESPIRACIÓN RESIDUAL DE CÉLULAS MOLIDAS DE SACCHAROMYCES CERIVISIAE HANSEN

El estudio de la respiración residual de células molidas ha sido llevado a cabo para dos estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN, cuya única diferencia rezide en un par de genes.

Esta respiración representa un 6 p. 100 aproximadamente de aquella de las suspensiones iniciales. El ciclo de Krebs deja de funcionar en los elementos molidos. El ácido pirúvico no queda prácticamente oxidado, pero da lugar a un intenso desprendimiento de gas carbónico. Los ácidos L- y D-láctico transformados en ácido pirúvico por los lacticocitocromo C reductasas siguen la misma vía de degradación y el término de su oxidación es un compuesto con dos carbonos, probablemente el etanal.

Las dos estirpes utilizadas demuestran las diferencias existentes en el metabolismo del ácido L-láctico. Estas diferencias quedan suprimidas por la molturación.

RIASSUNTO

STUDIO DELLA RESPIRAZIONE RESIDUA DI CELLULE TRITURATE DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE HANSEN

Lo studio della respirazione residua dei triturati è stata fatta per due deppi di *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN i quali non differiscono che per una coppia di geni.

Questa respirazione rappresenta circa il 6 p. 100 di quella delle sospensioni di partenza. Il ciclo di Krebs non funziona più nei triturati. L'acido piruvico non è praticamente ossidato, ma dà luogo ad uno sprigionamento di gas carbonico intenso. Gli acidi L-D-Lattico trasformati in acido piruvico dai lattico-citocromi C reduttasi seguono la stessa via di degradazione, e il termine della loro ossidazione è un composto a due carboni probabilmenta l'étanal.

I due ceppi utilizzati mostrano delle differenze nel metabolismo dell'acido L-lattico. Queste differenze sono soppresse dalla triturazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIZEAU C., GALZY P., 1965. Étude de la respiration de quelques substrats non fermentescibles par *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 275-289.

BIZEAU C., GALZY P., 1966. Influence de la mutation du gène PL_5 vers pl_5 sur le volume cellulaire d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN dans diverses conditions expérimentales. *C. R. Acad. Sci.* série D, **263**, 116-119.

BIZEAU C., GALZY P., VEZINHET Françoise, 1966. Observations sur le mode d'action des gènes de la série PL. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, **12**, 105-110.

EPHRUSSI B., HOTTINGUER H., CHIMENES A. M., 1949 *a*. Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation « petites colonies ». *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 351.

EPHRUSSI B., HOTTINGUER H., TAVLITZKI T., 1949 *b*. Action de l'acriflavine sur les levures. II. Étude génétique du mutant « petites colonies ». *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 419.

GALZY P., 1964 *a*. Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 109-259.

GALZY P., 1964 *b*. Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur des substrats non glucidiques. *Heredity*, **19**, 731-733.

GALZY P., 1964 *c*. Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 230-242.

GALZY P., BIZEAU C., BIZEAU Émilienne, 1967. Étude de la morphologie coloniale de *Saccharomyce cerevisiae* HANSEN en fonction du substrat de croissance et du génotype. *C. R. Soc. Biol.*, **161** (1), 133.

KOTYK A., 1963. pH intracellulaire de la levure de bière. *Folia Microbiologica*, 827-831.

ROODYN D. B., WILKIE D., 1967. A characteristic pattern of respiratory enzymes in cytoplasmic « Petite » strains of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by multiple enzyme analysis. *Biochem. J.*, **103**, 30.

RUIZ AMIL. 1966. Cellular distribution of yeast pyruvate decarboxylase and its induction by glucose. *Arch. Mikrobiol.*, **55**, 46-53.

SLONIMSKI P. P., 1953. *Formation des enzymes respiratoires chez la levure.* Masson édit. Paris.

SOMLO Marie., 1965. Induction des lactico cytochromes C réductases D- et L- de la levure aérobie par les lactates D- et L-. *Biochim. biophys. Acta*, **97**, 183.

STRICKLAND., 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. gen. Microbiol.*, **5**, 698.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (1), 93-98.

NOTE DE LABORATOIRE

MÉTHODE DE PURIFICATION DE L'ENSEMBLE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DU VIN

M. FLANZY, S. AUBERT

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Le réactif au sulfate acide mercurique de SÉMICHON-FLANZY permet d'obtenir une bonne séparation des substances polyphénoliques du vin. Ces composés précipités sont régénérés par décomposition du complexe par l'hydrogène sulfuré.

L'identification des produits isolés et les dégradations éventuelles sont étudiées.

INTRODUCTION

L'acétate de plomb en milieu neutre ou alcalin est le réactif le plus couramment utilisé pour isoler et purifier les substances polyphénoliques d'extraits végétaux et du type : anthocyanes, tanins, flavones, chalcones, aurones, etc. (PAECH, TRACEY, 1955).

Toutefois, la récupération des composés phénoliques d'un extrait ou d'un vin n'est pas toujours totale avec cet agent de précipitation. En outre, le pH basique du milieu est propice à des dégradations importantes (DEIBNER, BOURZEIX, 1963).

Nous avons pensé utiliser le réactif au sulfate mercurique, en milieu acide, de SÉMICHON-FLANZY (1926) avec plusieurs buts :

1° des recherches analytiques sur la composition de ces substances (FLANZY, AUBERT, 1967, 1968) ;

2° l'obtention de solutions de polyphénols du vin destinées à la préparation de milieux de culture de microorganismes où les polyphénols représentent la seule source de carbone (études sur l'épuration des vinasses de distilleries) ;

3° la purification d'extraits étalons pour les méthodes de dosage des polyphénols du vin.

Le traitement des polyphénols en milieu légèrement acide a pour princip avantage de limiter les phénomènes d'oxydation.

Dans un premier mémoire (FLANZY, AUBERT, 1967), fait dans un but différen on a montré que, dans des conditions bien précises, on peut avoir une action séle tive de ce réactif au sulfate acide mercurique ; ceci a permis de mettre en éviden des différences de comportement entre divers types de vins.

Dans un autre travail (FLANZY, AUBERT, 1968), il apparaît que le mercur s'associe avec les composés phénoliques du vin : anthocyanes et tanins, et qu'il s forme un complexe stable où le mercure représente quantitativement environ la moitié de l'extrait sec. On a révélé dans ce précipité la présence de composés phéno liques du type leucoanthocyanes à côté des colorants rouges habituellement présents la confrontation entre taches chromatographiques, sans identification précise, éta suffisante dans le but particulier poursuivi.

Cette note se propose de préciser quels sont les autres composés phénolique qui sont régénérés sur le précipité mercurique et le rendement approximatif de récu pération, ainsi que les dégradations éventuelles par les opérations de purification

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

a) *Préparation de l'extrait purifié*

A 100 ml de vin (1 volume) on ajoute 2 à 3 ml de réactif mercurique de SÉMICHON-FLANZ (1926), puis on agite quelques minutes. La suspension violacée est centrifugée à environ 1 500 pendant 5 minutes ; on élimine le liquide surnageant.

Le précipité est remis en suspension dans 100 ml d'eau distillés (1 volume) ; on centrifuge élimine ce premier liquide de lavage. On effectue un deuxième lavage, dans les mêmes condition avec de l'alcool à 50 p. 100. Le précipité est dispersé, par forte agitation, dans le milieu 100 m (1 volume) alcool éthylique à 50 p. 100. Les lavages et la régénération peuvent être éventuellemen multipliés et diversifiés avec d'autres solvants plus ou moins sélectifs en vue d'autres recherche analytiques.

On décompose ensuite le complexe mercurique par l'hydrogène sulfuré, introduit par un le barbotage pendant une dizaine de minutes, sous hotte, jusqu'à excès ; la suspension doit pass d'une teinte rouge à noirâtre et des grains de sulfure mercurique noir, plus ou moins peptisés, so décelables dans le ballon.

On filtre les sulfures en suspension dans la liqueur de polyphénol sur un büchner de 100 150 mm de diamètre muni d'un papier-filtre et garni d'un lit de silice pure de 2 à 4 mm d'épaisse pour retenir le sulfure mercurique.

Le filtrat rouge foncé, mais limpide, est évaporé dans un évaporateur rotatif, sous vide, température inférieure à 50°. On concentre au 1/4 environ pour s'assurer que tout l'alcool est chass

On filtre ensuite sur papier et on étend à 100 ml (1 volume) avec les eaux de lavage du filtre.

On obtient ainsi un milieu simplifié contenant essentiellement des polyphénols et des trace d'autres substances que nous pouvons nous attacher à identifier dans d'autres recherches (pectine par exemple).

b) *Évaluation des composés phénoliques totaux*

On utilise les absorptions caractéristiques des anthocyanes dans le visible, par le pic dans zone 520-550 mμ, et des matières tannoïdes totales par le pic en ultraviolet à 275-280 mμ. On admis que les hauteurs de ces deux pics donnaient des indices permettant des comparaisons ent colorants et tanins de l'extrait et du vin initial.

c) *Identification des composés phénoliques*

Les anthocyanes, glucosides et aglucones, sont identifiés par chromatographie sur couche min de cellulose avec le solvant : butanol-acide acétique-eau (4-1-5). L'évaluation des teneurs relative dans le vin et l'extrait est effectuée à l'aide d'un densitomètre Chromoscan (Joyce, Lœbl et C G. B.).

Les flavonols ont été isolés et différenciés par la technique de BOURZEIX et BANIOL (1966).

Les leucoanthocyanes totaux sont mis en évidence par leur transformation en cyanidol par chauffage, 30 minutes à 100°, en milieu butanol (60 v)-acide chlorhydrique pur (40 v).

Les tanins catéchiques ou leucoanthocyaniques peu condensés, c'est-à-dire plus difficilement éliminés par la gélatine, peuvent aussi être révélés par leur réaction spécifique avec la vanilline sulfurique. Ces deux techniques permettent de différencier les structures des tanins des vins rouges (RIBÉREAU-GAYON, STONESTREET, 1966).

Les méthodes de révélation des acides phénols du vin ont été également précisées par RIBÉREAU-GAYON (1964).

RÉSULTATS

Un vin de *Carignan noir* (origine : Domaine de Pech-Rouge, Narbonne, Aude) et l'extrait correspondant ont été confrontés après dilution dans les mêmes milieux (éthanol-chlorhydrique et éthanol-eau), afin d'obtenir des densités optiques voisines ; l'ensemble des valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau 1. On a donné également le rapport brut entre les deux indices de composés phénoliques, afin de voir les variations relatives entre ces deux types de constituants.

TABLEAU 1

Milieu de dilution Échantillon	Anthocyanes (A) Log $\frac{I_0}{I}$ à 540 mμ	Tannoïdes (T) Log $\frac{I_0}{I}$ à 280 mμ	$\frac{A}{T}$ (%)	Observations
Éthanol-Eau (50-50 v)				
Vin dilué en 1/100	0,055	0,530-0,540	10,3	
Extrait brut au 1/50	0,052	0,555	9,4	Légère perte de A
Extrait brut stérilisé au 1/50 ..	0,038	0,578	6,6	Concentration et forte perte de A
Éthanol 96-HCl pur (2 p. 100 v)				
Vin dilué au 1/100	0,157	0,630	25,1	
Extrait brut au 1/50	0,102	0,650	15,7	Nette perte de A
Extrait brut stérilisé au 1/50	0,062	0,685	9,0	Concentration et forte perte de A

TABLEAU 2

Taches chromatographiques par Rf croissants	Intensités relatives par densitométrie		
	Vin	Extrait brut	Observations
Tache rouge brunâtre des Tannoïdes au départ ...	15	12	(spot et trainée)
Anthocyanes glucosides 1	9	3	(delphinidol)
Anthocyanes glucosides 2	11	3	(pétunidol)
Anthocyanes glucosides 3	27	7	(cyanidol-malvidol)
Anthocyanes glucosides 4	4	1	(pelargonidol-paœnidol)
Anthocyanes aglucones	14	3	(tache globale)

Le tableau 1 rapporte également les valeurs obtenues sur le même extrait stérilisé à 120°C pour préparer un milieu de culture de microorganismes destinés à transformer les polyphénols.

Le tableau 2 donne une évaluation densitométrique grossière des différentes taches d'anthocyanes observées par chromatographie sur couche mince. Il faut préciser que la concentration et la quantité des deux échantillons ne sont pas comparables ; mais pour un même échantillon on peut évaluer l'importance relative de chaque tache. Dans le cas de l'extrait, les taches sont moins bien séparées malgré un dépôt moins important au départ du chromatogramme.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Quantitativement, le tableau 1 permet de déterminer les rendements de récupération des colorants et tanins.

La confrontation des produits : Volume (vin ou extrait) $\times$ dilution $\times$ $\log \frac{I_0}{I}$ nous a permis de calculer les rendements de purification. Nous trouvons ainsi :

a) Dans le cas des anthocyanes (indice à 540 mμ) :

dans le milieu éthanol 50 p. 100 : 59 p. 100 ;
dans le milieu éthanol 96-HCl 2 p. 100 v : 41 p. 100.

b) Dans le cas des matières tannoïdes totales (indice à 275-280 mμ) :

dans le milieu éthanol 50 p. 100 : 65 p. 100
dans le milieu éthanol 96-HCl 2 p. 100 v : 64 p. 100.

Il apparaît que les matières colorantes sont moins bien récupérées ou plus dégradées par les opérations d'extraction que les substances polyphénoliques totales. On remarque aussi que les pigments rouges, pseudobases anthocyaniques, exaltés par le milieu acide éthanol chlorhydrique, sont moins bien conservés pendant la purification que les colorants qui donnent la teinte normale de l'extrait ou du vin en milieu éthanolique. L'extrait brut stérilisé par chauffage en autoclave à 120°C confirme que la chaleur dégrade peu les polyphénols totaux, mais que les anthocyanes accusent une baisse très sensible.

La stérilisation du milieu, en vue de préparer un milieu de culture dans une liqueur de polyphénols, entraîne une perte de colorants de l'ordre de 30 p. 100 de la quantité initiale de l'extrait brut.

Qualitativement, nous nous sommes attachés à vérifier dans l'extrait l'évolution des principaux polyphénols inventoriés dans les vins.

Le tableau 2 montre que les anthocyanes glucosides du vin se retrouvent bien dans l'extrait, approximativement dans les mêmes proportions ; donc pas de dégradation préférentielle très importante de ces constituants.

La méthode Bourzeix-Baniol (1966) montre bien la présence de flavanols dont 2 aglucones et 2 glucosides (quercétol et myricétol essentiellement).

La présence de leucoanthocyanes, ou de proanthocyanes, se traduit par la formation abondante de cyanidol par chauffage en milieu acide et est confirmée soit directement par différence de densité optique (à 540 mμ), soit par chromatographie sur couche mince et comparaison avec un étalon commercial (Fluka).

De même, la réaction avec la vanilline, en milieu très acide, nous renseigne sur la présence de tanins peu condensés ou plutôt sous une forme particulière (associations où les positions 6 et 8 du noyau A phloroglucinol sont libres et un des OH engagé dans l'hétérocycle central des flavanes). L'intensité relative des deux réactions précédentes donne un rapport normal (voisin de 1) entre ces deux indices de tanin d'un vin de macération.

L'examen des chromatogrammes sur couche mince de cellulose révèle plusieurs taches fluorescentes bleues et vertes, généralement exaltées ou modifiées par les vapeurs d'ammoniac, qui attestent de la présence de composés appartenant au groupe des acides-phénols : benzoïques et cinnamiques. Notons que pour certaines taches l'intensité de la fluorescence apparaît plus forte que pour le vin initial ; ceci signifierait que ces acides-phénols proviennent de dégradations partielles des autres polyphénols, en particulier des anthocyanes, ou d'une meilleure récupération.

En conclusion, l'extrait purifié s'avère contenir l'ensemble des composés phénoliques présents dans les vins, mais avec quelques modifications appréciables des proportions respectives des différents types de polyphénols.

Reçu pour publication en avril 1968.

SUMMARY

METHOD FOR PURIFYING THE PHENOLIC COMPOUNDS OF WINE

A method for extracting and purifying the phenolic compounds of wine is set forth, being based on precipitation with the SÉMICHON-FLANZY mercuric/acid reagent, and regeneration by a stream of sulphurated hydrogen in a hydroalcoholic medium.

The recovery yield of the colouring matter and tannins ranges from 50 to 65 p. 100. All types of polyphenols are found once again in the extract, but seemingly the anthocyanins are somewhat damaged by the effects of heat.

RESUMEN

METODO DE PURIFICACIÓN DEL CONJUNTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

Se propone un método de extracción y de purificación del conjunto de los compuestos fenólicos del vino, fundamentado en la precipitación por el reactivo mercúrico ácido de SÉMICHON-FLANZY y regeneración por una corriente de hidrógeno sulfurado en medio hidroalcohólico.

El rendimiento de recuperación de los colorantes y taninos se sitúa en los alrededores de un 50 a un 65 p. 100. Todos los tipos de polifenoles se encuentran en el extracto, pero puede apreciarse que los antocianos quedan en parte degradados, y en particular cuando quedan sometidos a la acción del calor.

RIASSUNTO

METODO DI PURIFICAZIONE DELL' INSIEME DEI COMPOSTI FENOLICI DEL VINO

Un metodo d'estrazione e di purificazione dell'insieme dei composti fenolici del vino è proposto avente per base la precipitazione a mezzo del reattivo mercurico acido di SÉMICHON-FLANZY e rigenerazione a mezzo d'una corrente d'idrogeno solforato in mezzo idroalcoolico.

Il rendimento del ricupero dei coloranti e dei tannini è situato tra il 50 e il 65 per cento. Tutti i tipi di polifenoli si ritrovano nell'estratto, ma si rivela che gli antociani sono in parte degradati, piu particolarmente sotto l'azione del calore.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOURZEIX M., BANIOL P., 1964. L'isolement des flavonols du vin par chromatographie sur couche mince de cellulose. *Ann. Technol. agric.*, **15**, (2), 211-217.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963. Sur l'extraction des composés phénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol. agric.* **12** (1), 287-312.

FLANZY M., AUBERT S., 1967. Observations sur la défécation des vins de *Vitis vinifera* et d'hybrides (Essai de différenciation des vins d'hybrides blancs). *Ann. Technol. agric.*, **16** (3), 241-250.

FLANZY M., AUBERT S., 1968. Contribution à l'étude de la différenciation des vins d'hybrides rouges par emploi du réactif sulfomercurique. *Ann. Technol. agric.* (à paraître).

PAECH K., TRACEY M. V., 1955. *In « Modern methods of plants analysis »*, Vol. **3**, p. 462-463. Éd. Springer-Verlag (Berlin).

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6** (3), 119-147.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. anal.*, **48** (4), 188-196.

SÉMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Falsif. Fraudes*, **207**, 208-227.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention: avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatres langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon le World List of Scientific Periodicals, où le Bulletin Signalétique du C.N.R.S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communication personnelle » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des produits végétaux, 11 - Narbonne France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur de la publication : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 11-1968.

Dépôt légal : 4e trimestre 1968. N° d'impression : 2601.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 17 1968 NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (2), 103-114.

ACTION DES ULTRA-SONS SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DU GLUTEN

II. — TRAITEMENT DU GLUTEN DE FARINE NORMALE

B. GODON, L. PETIT

avec la collaboration technique de Jeanine Ooghe et B. Bargas

Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales et de leurs Dérivés,
C. E. R. D. I. A., Le Noyer-Lambert, 91 - Massy
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'étude de l'action des ultra-sons sur le gluten de blé a permis de montrer que celui-ci est beaucoup moins sensible dans l'état natif que dispersé dans l'acide acétique. Les auteurs en discutent les raisons.

Cette action sur le gluten à l'état dispersé se traduit principalement par une dépolymérisation de la fraction gluténine. Il est vraisemblable que le même phénomène affecte les autres constituants protéiques mais il est alors plus difficile à mettre en évidence d'une façon certaine : il est net toutefois, dans le cas de la β-amylase.

INTRODUCTION

Dans une précédente publication (Godon, Petit, 1967) nous avons indiqué les raisons pour lesquelles nous avons retenu le traitement par les ultra-sons comme moyen d'action physique sur le gluten ; ceci dans le but de contribuer à la connaissance de sa structure par l'étude des modifications qui peuvent être ainsi produites. Après y avoir décrit les diverses techniques de traitement et d'analyse utilisées, nous allons exposer ici les résultats obtenus sur le gluten d'une farine industrielle normale à base de blé type *Manitoba*.

Les résultats relatifs au gluten de la même farine préalablement privée de lipides ou de protéines solubles feront l'objet d'une publication ultérieure.

RÉSULTATS

Les résultats des tableaux (1-2), concernant l'action des différentes fréquences d'ultra-sons sur le gluten sont donnés comparativement à ceux d'un échantillon témoin ayant subi un traitement analogue, excepté l'action des ultra-sons. Ces échantillons sont constitués soit par du gluten natif soit par une dispersion de gluten dans l'acide acétique.

1. *Action des ultra-sons sur le gluten à l'état natif* (tabl. 1)

Chacune des valeurs rapportées est la moyenne du nombre de mesures indiqué à la 1re ligne du tableau.

La *solubilité* est chiffrée en pourcentage du poids sec initial mis en solution après dispersion du gluten et centrifugation à 10 000 *g* pendant 20 minutes. La *viscosité* est exprimée en viscosité intrinsèque $\eta_{sp/c}$ où $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$, η_0 étant la viscosité de l'acide acétique N/100.

Il apparaît que le traitement ultra-sonore provoque une légère baisse de la solubilité du gluten. On ne peut parler de variations systématiques en fonction de la fréquence ; cependant, l'effet le plus prononcé est observé à 576 kHz. Nous observons aussi une diminution générale de la viscosité, un effet plus accentué à 576 kHz, ainsi d'ailleurs qu'à 340 kHz.

Dans le cas de ce gluten natif, les résultats de *la chromatographie sur gel de Sephadex* sont exprimés seulement en pourcentage de densité optique de chaque fraction par rapport à celle de la prise d'échantillon. En effet les mesures de densité optique effectuées directement sur les effluents ont montré qu'en général il n'y avait pas de variations importantes en fonction de la fréquence de traitement et qu'il était donc inutile d'avoir recours aux mesures de compositions pondérales. Les protéines solubles dans l'acide acétique sont séparées en quatre fractions (fig. 1 A) dont les caractères ont été indiqués dans d'autres publications (Godon, Nuce de Lamothe et Petit, 1964 ; Godon, Richard et Petit, 1967).

Le traitement ultra-sonore du gluten à l'état natif est pratiquement sans effet sur la composition protéique de cette partie soluble ; cependant nous noterons que les traitements à 23 et 576 kHz (fig. 1 B) affectent sensiblement les fractions 1 correspondantes ; les modifications observées sont certainement significatives en raison du nombre d'essais effectués dans ces conditions.

L'électrophorèse en gel d'amidon a été utilisée pour étudier aussi bien les dispersions acétiques obtenues après traitement ultra-sonore que leurs divers constituants séparés par gel-filtration. Les fractions sont alors amenées à sec par cryodessiccation et les résidus remis en solution dans un tampon lactate d'aluminium ; les matériels sont aisément dissous sauf ceux des fractions I, dont la majeure partie reste insoluble même en présence d'urée ; dans une moindre mesure, il en est de même de la fraction IV. Dans l'interprétation des résultats, il faudra donc se rappeler que les diagrammes électrophorétiques relatifs à ces fractions ne représentent qu'une partie éventuellement faible des substances collectées.

TABLEAU I

Gluten natif

		Témoin	Fréquences de traitement (en kHz)								
			23	190	240	340	412	576	660	740	970
Nombre d'expériences		20	4	3	3	5	7	9	9	4	4
Solubilité		74,6	69,5	70,6	68,7	70,8	69,5	67,5	69,6	69,3	70,3
η *sp/c*		40,5	—	37,8	34,7	32,7	35,8	32,8	35,4	36,7	35,2
Densité optique (%)	Fraction I	4,1	1,2	4,0	4,1	4,7	5,0	2,2	3,9	4,5	4,9
	Fraction II	24,5	29,8	24,2	23,7	23,2	24,0	23,7	25,2	23,3	23,9
	Fraction III	47,4	51,2	46,7	48,5	47,0	48,2	49,2	47,5	46,2	46,5
	Fraction IV	19,0	19,2	19,4	20,1	19,5	18,2	20,2	19,8	20,5	19,0
	Total	95,0	101,5	94,3	96,4	94,4	95,4	95,3	96,4	94,5	94,3

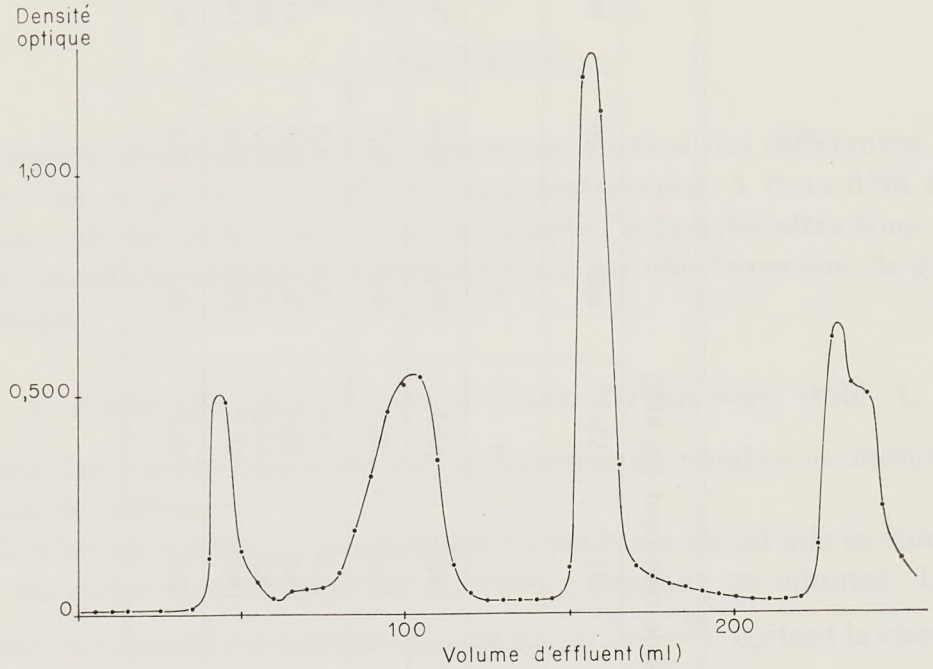


Fig 1A

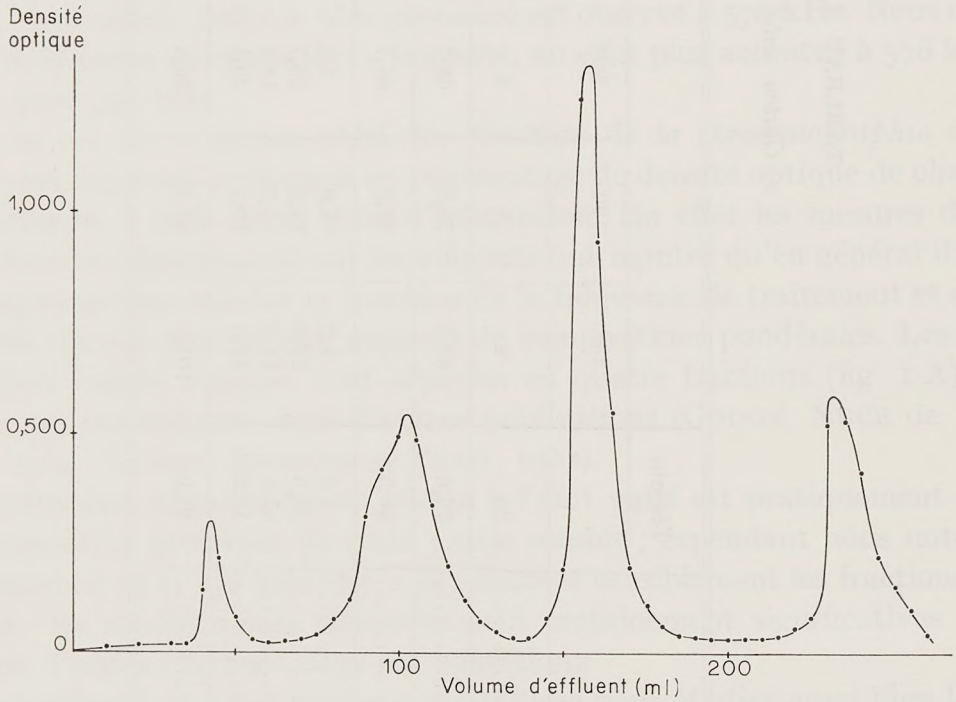


Fig 1B

FIG. 1. — *Chromatographie sur gel de Sephadex*

(Sephadex G. 100 ; volume total du gel : 100 ml ; dépôt de 3 ml de dispersion acétique de gluten (soit 45 mg de gluten sec) ; éluants successifs : eau-acide acétique 0,02 N — amoniaque 0,02 N)

Diagrammes d'élution :

A — d'une dispersion de gluten témoin
B — d'une dispersion de gluten ultrasonné à l'état natif (à 576 kHz)

De l'observation des diagrammes électrophorétiques des divers pics obtenus par chromatographie sur Sephadex à partir de la dispersion de gluten non traité il apparaît que (fig. 2) :

— les différentes fractions donnent plusieurs bandes ; elles sont donc formées d'un ensemble de protéines ayant des mobilités électrophorétiques variables ;

— les mobilités électrophorétiques vont, en moyenne, en augmentant de la première à la quatrième fraction ;

— en l'absence d'inhibiteur enzymatique, la β-amylase se répartit entre la seconde et la troisième fraction, avec une prédominance dans cette dernière.

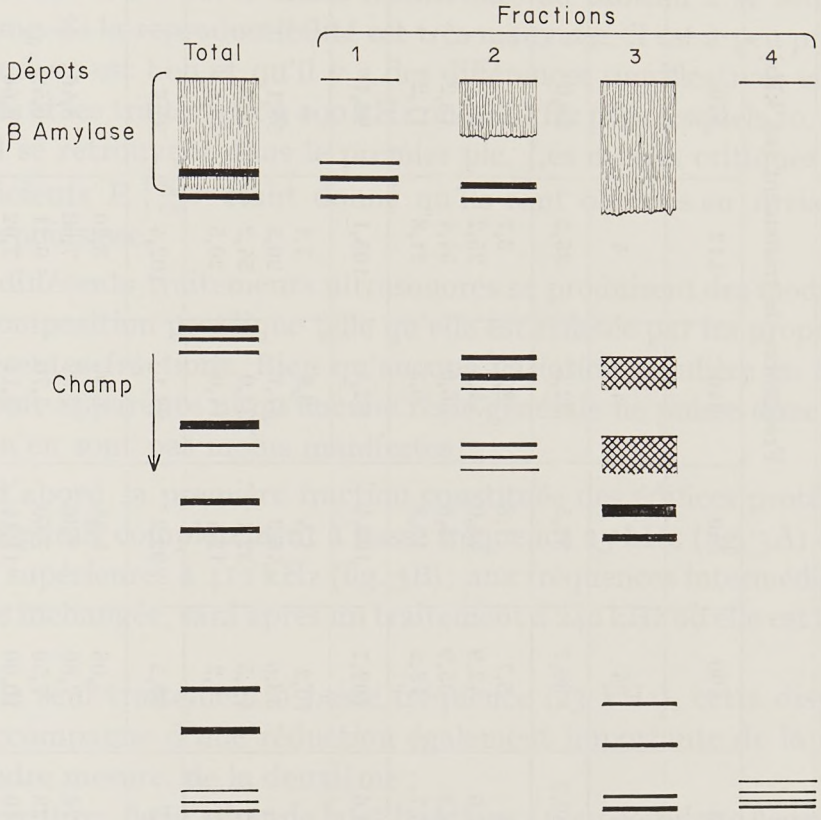


FIG. 2. — *Diagramme électrophorétique d'une dispersion de gluten témoin*
(électrophorèse en gel d'amidon ; tampon lactate d'aluminium : pH 3,10, conductivité = 500 microhms/cm ; dépôt de 250 à 350 γ de protéines ; champ électrique 9-10 V/cm ; durée : 4 à 5 heures)

Comme la méthode précédente, l'électrophorèse en gel d'amidon montre qu'aucun changement significatif n'intervient dans le gluten ultrasonné à l'état natif : même après traitement à 576 kHz, fréquence qui modifie légèrement la répartition des protéines en chromatographie sur gel, les diagrammes électrophorétiques des dispersions acétiques et des différents pics séparés sur Sephadex sont identiques à ceux des échantillons non traités. S'il y a quelques altérations, elles sont trop faibles pour être mises en évidence.

2. *Action des ultra-sons sur le gluten en dispersion* (tabl. 2)

Dans ce cas, l'effet des ultra-sons sur la *viscosité* est beaucoup plus marqué que précédemment ; là encore la fréquence de 576 kHz se montre particulièrement efficace la baisse de viscosité est de 30 p. 100, au lieu de 10 p. 100 pour les autres fréquences

TABLEAU 2

Gluten dispersé

Traitement		Témoin	Fréquences de traitement (en kHz)								
			23	190	240	340	412	576	660	740	970
Nombre d'expériences		20	4	4	4	4	4	4	4	4	4
η *sp/c*		40,5	30,2	36,7	32,5	32,5	36,2	28,0	32,5	32,5	34,5
Densité optique (%)	Fraction I	4,1	0	5,7	1,8	8,7	3,7	0	0	0	0
	Fraction II	24,5	32,6	42,9	48,0	41,5	25,2	62,7	66,0	33,6	35,0
	Fraction III	47,4	54,3	35,9	36,8	36,0	54,4	18,2	21,2	51,1	54,7
	Fraction IV	19,0	16,7	18,2	13,8	6,2	21,8	11,2	10,7	10,0	10,4
	Totai	95,0	103,6	102,7	100,4	92,4	105,1	92,1	97,9	94,7	100,1
Bilan pondéral (%)	Fraction I	9,6	0	10,2	1,4	8,8	7,1	0	0	0	0
	Fraction II	34,2	27,4	33,6	46,3	37,1	20,5	58,1	48,7	25,2	26,2
	Fraction III	46,9	67,2	46,5	32,1	33,0	54,3	23,0	19,2	58,4	56,2
	Fraction IV	9,5	3,9	9,2	12,4	14,0	20,5	10,6	32,0	10,2	9,9
	Total	100,2	98,5	99,5	92,2	93,1	102,4	91,7	99,9	93,8	92,3
E 1 % 1 cm	Fraction I	2,20		3,06	4,55	6,96	3,20				
	Fraction II	7,78	7,78	7,80	9,36	7,87	7,63	8,46	10,67	8,50	8,53
	Fraction III	7,88	5,28	7,50	7,60	7,70	6,21	6,52	8,70	6,35	6,22
	Fraction IV	9,56	9,10	10,00	11,14	3,11	7,02	8,66	2,63	7,05	6,70
	Solution initiale	8,23	6,88	8,19	8,88	7,33	7,44	8,72	8,88	7,30	6,40

Les résultats de la *chromatographie sur gel de Sephadex* sont exprimés ici de deux manières : en pourcentage de densité optique et en pourcentage pondéral de chaque fraction par rapport à la prise d'échantillon.

En ce qui concerne le poids des différentes fractions, certaines remarques critiques s'imposent : la quantité de protéines déposées sur la colonne est de l'ordre de 45 mg ; lorsque nous indiquons un pourcentage récupéré aussi faible que 1,4 p. 100 par exemple (fraction I après traitement de la solution à 240 kHz) cela signifie qu'il a fallu récupérer dans cette fraction 0,63 mg de matériel après séchage. Il est évident que les erreurs peuvent être très importantes. En fait, dans ce même cas particulier, les quantités récupérées au cours des 4 essais mentionnés au tableau 2 se sont échelonnées entre 0,5 et 1 mg. Si la reproductibilité est très mauvaise, il est à peu près certain que l'ordre de grandeur est bon et qu'il y a des différences significatives entre ce traitement à 240 kHz et les traitement à 190 kHz ou 340 kHz pour lesquels 10, 2 et 8,8 p. 100 du poids total se retrouvent dans le premier pic. Les mêmes critiques sont valables pour les coefficients $E\,^{1\,\%}_{1\,cm}$, étant donné qu'ils sont obtenus en divisant la densité optique par le poids sec.

Lors des différents traitements ultrasonores se produisent des modifications profondes de la composition protéique telle qu'elle est reflétée par les proportions pondérales des différentes fractions. Bien qu'aucune variation régulière en fonction de la fréquence ne soit apparente ni qu'aucune règle générale ne puisse donc être dégagée, certains faits n'en sont pas moins manifestes :

— tout d'abord la première fraction constituée des édifices protéiques les plus volumineux disparaît complètement à basse fréquence 23 kHz (fig. 3A) et pour toutes les fréquences supérieures à 412 kHz (fig. 3B) ; aux fréquences intermédiaires elle subsiste à peu près inchangée, sauf après un traitement à 240 kHz où elle est très fortement réduite ;

— pour le seul traitement à basse fréquence (23 kHz), cette disparition de la fraction I s'accompagne d'une réduction également importante de la quatrième et, dans une moindre mesure, de la deuxième ;

— la disparition de la 1re et de la 4e fractions a pour corollaire nécessaire une modification des répartitions des constituants entre les 2 autres fractions.

La fraction IV restant constante, sauf dans deux cas : 412 et 660 kHz (fig. 3C), on pourrait penser que ce réarrangement se produit uniquement entre les trois premières fractions. En fait, ce n'est là qu'une apparence et les échanges sont certainement plus complexes. C'est ainsi qu'après les traitements à 576 kHz, la deuxième fraction voit augmenter à la fois son importance pondérale et son coefficient d'extinction ; or il est manifeste que son enrichissement pondéral ne peut provenir de la seule migration des constituants de la fraction I (en quantités insuffisantes pour le justifier). Donc, des constituants des 3e et 4e fractions doivent être mis en cause. Comme le coefficient d'extinction élevé des constituants de la fraction IV est seul à pouvoir rendre compte de l'accroissement du coefficient $E\,^{1\,\%}_{1\,cm}$ constaté à la fraction II, il semble évident que certains d'entre eux se trouvent, après traitement ultrasonore, localisés au niveau de cette deuxième fraction.

La figure 4 représente un exemple caractéristique des résultats de *l'électrophorèse*. Si l'on considère les dispersions entières de gluten, il est manifeste que le diagramme de la dispersion de gluten traitée est plus complexe que celui de la dispersion témoin (fig. 2)

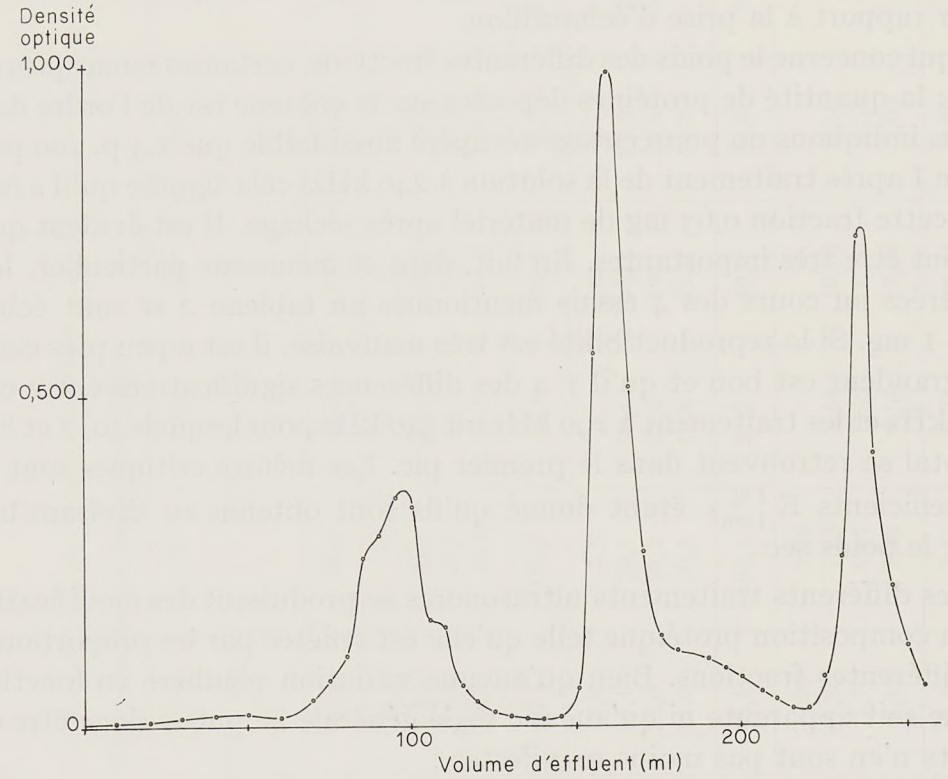

Densité
optique
1,000
0,500
0
100
200
Volume d'effluent (ml)

FIG. — 3A

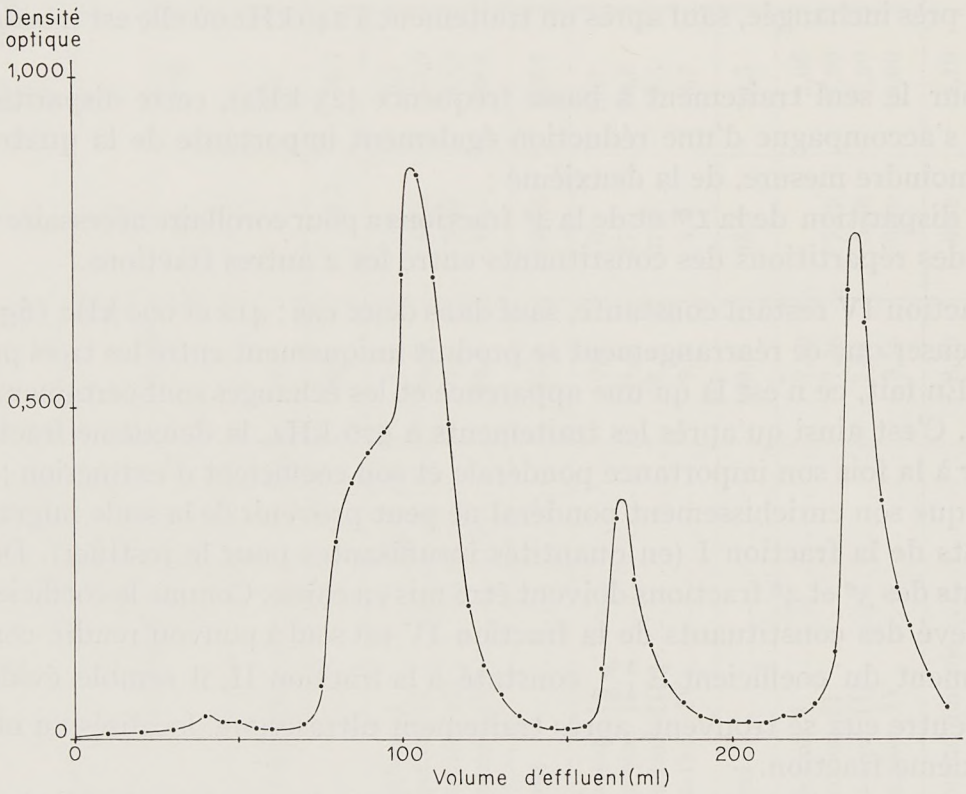

Densité
optique
1,000
0,500
0
0
100
200
Volume d'effluent (ml)

FIG. — 3B

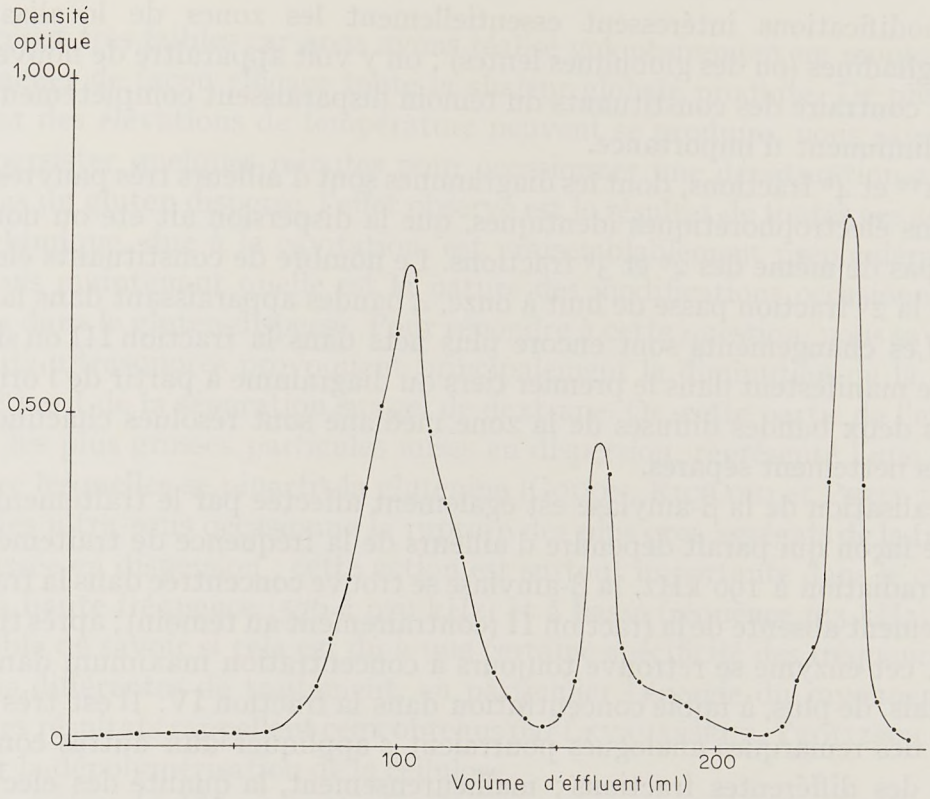


FIG. — 3 C

FIG. 3. — *Chromatographie sur gel de Sephadex*
(conditions : voir légende de la figure 1). Diagrammes d'élution des dispersions de gluten ultrasonnées :

A — 23 kHz
B — 776 kHz
C — 660 Hkz

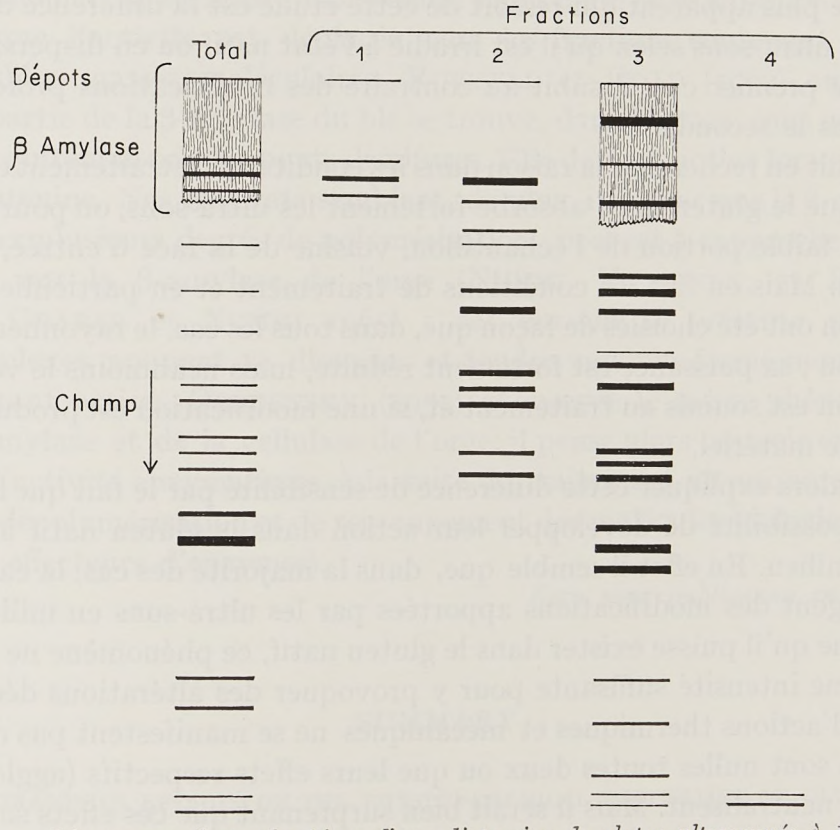


FIG. 4. — *Diagramme électrophorétique d'une dispersion de gluten ultrasonnée à 190 kH*
(conditions : voir légende de la figure. 2)

Les modifications intéressent essentiellement les zones de localisation des albumines-gliadines (ou des globulines lentes) : on y voit apparaître de nouvelles raies alors qu'au contraire des constituants du témoin disparaissent complètement ou tout au moins diminuent d'importance.

Si les 1re et 4e fractions, dont les diagrammes sont d'ailleurs très pauvres, ont des compositions électrophorétiques identiques, que la dispersion ait été ou non traitée, il n'en est pas de même des 2e et 3e fractions. Le nombre de constituants électrophorétiques de la 2e fraction passe de huit à onze, 4 bandes apparaissant dans la zone des gliadines. Les changements sont encore plus nets dans la fraction III où six bandes nouvelles se manifestent dans le premier tiers du diagramme à partir de l'origine. Par ailleurs, les deux bandes diffuses de la zone médiane sont résolues chacune en trois composants nettement séparés.

La localisation de la β-amylase est également affectée par le traitement ultrasonore, d'une façon qui paraît dépendre d'ailleurs de la fréquence de traitement. Alors qu'après irradiation à 190 kHz, la β-amylase se trouve concentrée dans la fraction III et complètement absente de la fraction II (contrairement au témoin) ; après traitement à 576 kHz, cet enzyme se retrouve toujours à concentration maximum dans la fraction III, mais, de plus, à faible concentration dans la fraction IV. Il est très vraisemblable que des remarques analogues pourraient s'appliquer aux autres constituants protéiques des différentes fractions ; malheureusement, la qualité des électrophorégrammes n'a pas toujours été telle que l'on puisse l'affirmer en toute certitude.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le trait le plus apparent qui ressort de cette étude est la différence de sensibilité du gluten aux ultra-sons selon qu'il est irradié à l'état natif ou en dispersion : très peu touché dans le premier cas, il subit au contraire des modifications profondes de ses propriétés dans le second.

On pourrait en rechercher la raison dans les conditions de traitement elles-mêmes : étant donné que le gluten natif absorbe fortement les ultra-sons, on pourrait objecter que seule une faible portion de l'échantillon, voisine de la face d'entrée, est soumise à l'irradiation. Mais en fait les conditions de traitement et en particulier l'épaisseur de l'échantillon ont été choisies de façon que, dans tous les cas, le rayonnement émergeant de l'échantillon ; sa puissance est fortement réduite, mais néanmoins le volume entier de l'échantillon est soumis au traitement et, si une modification est produite, elle doit affecter tout le matériel.

On peut alors expliquer cette différence de sensibilité par le fait que les ultra-sons n'ont pas la possibilité de développer leur action dans le gluten natif à cause de la structure du milieu. En effet il semble que, dans la majorité des cas, la cavitation soit le principal agent des modifications apportées par les ultra-sons en milieu liquide. A supposer même qu'il puisse exister dans le gluten natif, ce phénomène ne pourrait pas y atteindre une intensité suffisante pour y provoquer des altérations décelables. Les autres types d'actions thermiques et mécaniques ne se manifestent pas non plus, soit parce qu'elles sont nulles toutes deux ou que leurs effets respectifs (agglomération et dispersion) se neutralisent. Mais il serait bien surprenant que ces effets se compensent pour toutes les fréquences ; par contre, il est tout à fait normal que les actions ther-

miques soient très faibles car nous avons réalisé volontairement un montage qui permet d'évacuer de façon efficace toute la chaleur globale produite. De plus, même si localement des élévations de température peuvent se produire, nous savons qu'elles doivent persister quelques minutes pour occasionner une dénaturation appréciable. Dans le cas du gluten dispersé, l'effet observé est le résultat de toutes ces actions mais l'action chimique, due à la cavitation, est vraisemblablement prépondérante.

Voyons maintenant quelle est la nature des modifications occasionnées par les ultra-sons dans le gluten dispersé. Pour répondre à cette question, nous savons que les traitements ultrasonores provoquent principalement la diminution ou la disparition de la fraction I de la séparation sur gel de dextrane. Or, cette partie de l'effluent, qui renferme les plus grosses particules mises en dispersion, représente l'une des 3 fractions entre lesquelles se répartit la gluténine (Godon, Richard et Petit 1967). Ainsi l'action des ultra-sons occasionne la rupture des plus gros agrégats de la fraction gluténine passée en dispersion ; cette action est surtout importante dans le cas des traitements à haute fréquence (576 à 970 kHz) et à basse fréquence (23 kHz), sans qu'il soit possible de savoir si cela est dû à une certaine spécificité des fréquences ou à des conditions différentes de traitement, en particulier l'énergie du rayonnement ultrasonore. Ces résultats rappellent ceux obtenus par Levavasseur, Troitzsch et Chaume (1954) sur la dépolymérisation de la cellulose.

Il est vraisemblable que cette dépolymérisation touche également d'autres constituants que ceux de la gluténine, puisque nous avons vu que de nombreux réarrangements doivent obligatoirement se produire pour que puissent être expliquées les variations de comportement en chromatographie sur gel. Mais ces modifications sont trop complexes pour pouvoir être, à l'heure actuelle, analysées.

En particulier, la structure moléculaire de la β-amylase subit cette dépolymérisation puisque l'activité est déplacée vers les fractions contenant des molécules de plus faibles masses moléculaires. Rowsell et Goad (1962) ont montré que la majeure partie de la β-amylase du blé se trouve, dans le grain, sous une forme inactive liée à la gluténine par des ponts disulfures. Elle devient active lorsqu'elle est séparée de la gluténine. Nos résultats semblent, de plus, indiquer que la β-amylase active peut posséder plusieurs degrés de polymérisation : ceci est à rapprocher des observations faites sur la β-amylase de l'orge (Nummi, Vilhunen, et Enari, 1965 ; Daussant, Grabar et Nummi 1965) : cet enzyme se présente sous plusieurs formes complexes pouvant se dissocier et tendre vers une forme monomère stable, tout en restant active. Obolensky, (1957) a observé le même phénomène dans le cas de l'α-amylase et de la cellulase de l'orge; il pense alors pouvoir expliquer l'augmentation d'activité enzymatique, à la suite du traitement ultrasonore, par ces phénomènes de dépolymérisation et de regroupement des molécules biologiques (enzymes, substrat ou effecteurs d'enzymes).

Reçu pour publication en avril 1968.

SUMMARY

Ultrasonics effects on the physico-chemical properties of gluten

Investigations on the effect of ultrasonics on gum gluten and acetic acid dispersions have shown that the first one is less sensitive than the dispersed form. The reason of this difference is discussed.

The action on dispersed gluten is mainly explained by a depolymerisation of the glutenin fraction ; the same phenomena affect probably the other protein constituents but it is much more difficult to prove with certainty. Nevertheless the action on β-amylase is evident.

ZUSAMMENFASSUNG

Wirkung der Ultraschallwellen auf die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Klebers

Ultraschallwellen haben auf nativen Weizenkleber eine sehr viel geringere Wirkung als auf in Eisessig dispergierten Kleber. Die Ursachen dieses Unterschiedes werden diskutiert. Die Wirkung fau Kleber in dispergiertem Zustand zeigt sich vor allem in einer Depolimerisation der Glutenin rafktion. Dasselbe Phänomen gilt wahrscheinlich auf für die anderen. Proteinkonstituenten, ist aber in dem Falle viel schwieriger darzustellen ; bei β-Amylase jedoch ist diese Wirkung deutlich.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Daussant J., Grabar P., Nummi M., 1965. β-amylase. II. Identification des différentes β-amylases dans l'orge et le malt. *European Brewery Conv., Proc. Congr. 12 th*, Stockholm, 62-69.

Godon B., Nuce de Lamothe M., Petit L., 1964. Fractionnement des protéines du gluten par filtration sur gel de dextrane. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 2574-2576.

Godon B., Richard H., Petit L., 1967. Étude des protéines du gluten par dispersion dans l'acide acétique et chromatographie sur gel de dextrane Sephadex. I. Méthodes expérimentales. *Industr. aliment. agric.*, **1**, 9-15.

Godon B., Petit L., 1967. Action des ultrasons sur les propriétés physico-chimiques du gluten. I. Matériel et méthodes. *Ann. Technol. agric.*, **16**, (3), 205-217.

Levavasseur G., Troitzsch M., Chaume G., 1954. Dispersion de la cellulose par les ultrasons. Observations au microscope électronique. *C. R. Réunion du groupe histologie Rayons X.*

Nummi M., Vilhunen R., Enari T. M., 1965. β-amylase. I. β-amylase of different molecular sizes in barley and malt. *European Brewery Conv., Proc. Congr. 12 th*, Stockholm, 52-61.

Rowsell E. V., Goad L. J., 1962. Latent β-amylase of wheat : its mode of attachement to glutenin and its release. *Biochem. J.*, **84**, 73 P-74 P.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (2), 115-150.

L'INSAPONIFIABLE DU BEURRE

I. — Essais des techniques d'étude

Simonne KUZDZAL-SAVOIE

avec la collaboration technique de Janine TRÉHIN

Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, 78-Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'insaponifiable du beurre et l'insaponifiable de diverses graisses animales ou végétales, retenues dans un but de comparaison, ont été soumis à differentes techniques de dosage et de fractionnement.

Les résultats obtenus montrent les grandes possibilités d'investigation offertes par l'emploi judicieux des méthodes chromatographiques.

INTRODUCTION

Dans un sens strict l'insaponifiable d'une huile ou d'une graisse est la fraction de cette huile ou de cette graisse qui ne peut pas être saponifiée, c'est-à-dire qui ne peut former de savons. Mais, en pratique, et dans le domaine analytique, l'insaponifiable est constitué par ce qui, après saponification, est extractible par le solvant utilisé.

Les teneurs en insaponifiable des huiles et graisses sont très variables (Deuel, 1951). Et, pour une huile ou une graisse définie, la quantité d'insaponifiable recueillie peut en outre varier légèrement en fonction des conditions de la saponification et de l'extraction subséquente (André et Henry, 1962).

La matière grasse du beurre étant constituée pour près de 98 p. 100 par des triglycérides, et le glycérol étant soluble dans l'eau, la fraction insaponifiable du beurre est relativement faible. Elle représente environ 0,3-0,5 p. 100 de la matière grasse (Jack et Smith, 1956; Shorland et Hansen, 1956; Kuzdzal-Savoie, 1959; Schwartz et *al* 1966). Une teneur voisine est trouvée dans le suif ou le saindoux.

Les huiles ou graisses alimentaires d'origine végétale contiennent généralement un peu plus de matière insaponifiable : de l'ordre de 1 p. 100 (FEDELI et *al.*, 1966).

A l'époque actuelle, caractérisée dans le domaine de la chimie analytique par un accroissement considérable de la sensibilité et de la spécificité des techniques, l'insaponifiable des huiles et graisses constitue un matériel dont l'étude approfondie peut être entreprise avec toutes les chances de succès.

Ces dernières années de nombreuses publications ont été présentées relatives à l'étude des constituants de l'insaponifiable. Nous en citerons seulement quelques-unes parmi les plus récentes : EISNER et *al.* (1965 et 1966), WALBECQ et WOLFF (1965), NIKOLAIDES (1965), COLAKOGLU (1966), FEDELI et *al.* (1966), KARLESKIND et *al.* (1966), PAQUOT et TASSEL (1966).

Toutefois, parmi les études sur l'insaponifiable global réalisées au moyen d'une méthodologie moderne, on ne trouve qu'un seul cas d'application au beurre (EISNER et *al.*, 1966).

L'insaponifiable du beurre, comme celui des autres corps gras est constitué par un ensemble complexe de composés. Certains de ceux-ci sont bien connus, (carotène, vitamine A, cholestérol, par exemple) ; pour d'autres l'étude n'a été qu'abordée (hydrocarbures, tocophérols, cires, alcools) et, sans doute, d'autres constituants restent à découvrir.

A côté de l'intérêt scientifique que présente en soi une meilleure connaissance des composés de l'insaponifiable du beurre, on peut trouver divers exemples d'application d'une telle étude.

Citons en premier lieu la mise au point de méthodes destinées à déceler toute addition de matière grasse étrangère à la graisse de lait ou au beurre. L'utilisation de l'insaponifiable à cette fin n'est pas une nouveauté (ROOS, 1963), mais la connaissance approfondie des constituants de l'insaponifiable permettrait d'accroître considérablement les possibilités de cette méthode.

Dans un autre ordre d'idées, il ne paraît pas impossible d'expliquer certaines différences d'arôme — celles sur lesquelles repose la notion des « crus » de beurre, par exemple — par des différences spécifiques atteignant les composés de l'insaponifiable.

Enfin, de plus en plus souvent, des traitements technologiques sont susceptibles de donner naissance à des « résidus » liposolubles, non lipidiques qui s'ajoutent donc aux composés naturels de l'insaponifiable. Citons, l'utilisation accrue des matériaux plastiques aux différents stades de la transformation et de la commercialisation des produits laitiers, l'usage des « enrobages » de fromage, l'emploi des insecticides, des détergents. Une meilleure connaissance des composés naturels de l'insaponifiable faciliterait la détection et le contrôle de ces « résidus ».

Dans le travail préliminaire que nous présentons ici, nous avons expérimenté diverses techniques de dosage et de fractionnement de l'insaponifiable du beurre et d'autres graisses animales ou végétales, retenues dans un but de comparaison. En outre, de nombreux essais d'identification des composés ont été effectués au cours d'un premier sondage.

Nous examinerons successivement les méthodes utilisées (I), les premiers résultats (II) qu'elles nous ont permis d'obtenir et les développements (III) que nous envisageons.

I. — MÉTHODES ET TECHNIQUES

A. — *Obtention de l'insaponifiable*

Nous avons très généralement utilisé une méthode d'obtention de l'insaponifiable très voisine de celle décrite par PAQUOT et *al.* (1962), qui comporte une extraction par l'oxyde d'éthyle. Au début de ce travail, nous l'avons comparée à la méthode ancienne décrite par LEMELAND (1923) que nous avions maintes fois utilisée lors du dosage du carotène dans le lait et les produits laitiers (KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1959).

B. — *Fractionnement de l'insaponifiable*

La chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne ont été concurremment employées. La chromatographie sur couche mince a comporté de nombreuses variantes dans le processus analytique suivi.

1. *Chromatographie sur couche mince.*

a) *Chromatographie unidimensionnelle.*

α) *En système normal.*

La plus grande partie du travail a été exécutée en utilisant comme support chromatographique du gel de silice G (préparé selon STAHL). Le gel de silice était mélangé à l'eau dans la proportion de 1 à 2 environ (p/p). D'une façon générale l'épaisseur de la couche recouvrant les plaques était de 0,3 mm. Cependant nous avons aussi utilisé des plaques comportant une couche de gel de silice de 0,5 mm et de 1 mm d'épaisseur. Les plaques une fois recouvertes étaient séchées à l'air libre. Elles étaient activées par chauffage 1 heure à 105°C (puis refroidies) avant l'emploi.

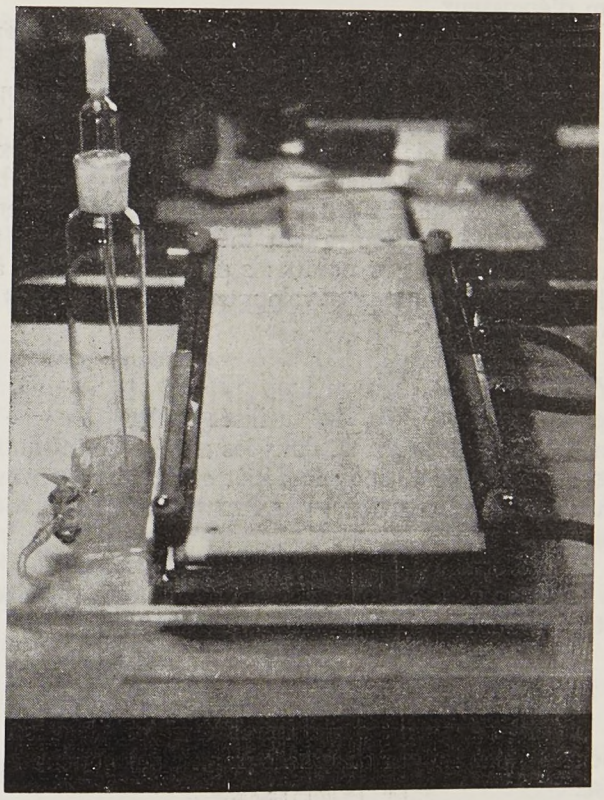


FIG. 1. — *Système B. N. (DESAGA) modifié : la migration du solvant s'étend sur 35 cm*

Les plaques utilisées ont été très généralement les plaques classiques de 20 cm × 20 cm. Toutefois nous avons effectué quelques essais avec des plaques de 40 cm × 20 cm (la migration du solvant se faisant sur 35 cm).

La chromatographie verticale ascendante a été constamment utilisée. Cependant, au cours des quelques essais sur grande plaque, la chromatographie horizontale, ou selon un plan légèrement incliné (afin d'accroître la vitesse de migration du solvant), a été utilisée.

La chromatographie sur petites plaques a été conduite dans des cuves classiques de 8 cm de largeur ; pour les grandes plaques, la migration sur 40 cm a été rendue possible en utilisant le système B. N. de DESAGA, dont la chambre de développement avait été auparavant allongée de 20 cm par une modification de construction (fig. 1).

Les dépôts ont été effectués par points (10 à 40 µl) ou parfois par bandes (150 µl environ), au moyen d'une pipette spéciale. Les substances étaient dissoutes le plus souvent dans l'oxyde d'éthyle. Des concentrations variables (de l'ordre de 2 à 10 p. 100) ont été utilisées.

Les solvants de développement employés au cours de la chromatographie unidimensionnelle et en phase normale ont été :

— benzène à 1,5 p. 100 ou à 1,8 p. 100 de méthanol (solvant le plus souvent utilisé),
— hexane à 10 p. 100 d'oxyde d'éthyle,
— chloroforme pur,
— hexane pur.

Les temps de migration ont été variables : trente minutes environ pour les petites plaques en chromatographie verticale ascendante et 2 h 30 à 3 heures pour les grandes plaques en chromatographie horizontale ou légèrement inclinée.

Après séchage les plaques étaient « révélées » à l'aide, très généralement, d'une solution d'acide phosphomolybdique à 20 p. 100 dans l'éthanol.

Certaines substances sont colorées à froid par ce révélateur, mais pour le plus grand nombre le chauffage est nécessaire, et les plaques étaient alors placées dans l'étuve à 105°C un temps variable selon la nature des composés.

β) *Chromatographie unidimensionnelle en système inversé.*

Nous avons utilisé une technique de chromatographie sur couche mince en phase inversée applicable à des composés relativement polaires : les stérols.

Le support chromatographique était du kieselguhr G (mélange de terre de diatomées et de sulfate de calcium). Mêlé à l'eau dans la proportion de 1 à 2 (p/p) il était étalé sur les plaques en une couche mince de 0,16 mm d'épaisseur.

Les plaques étaient ensuite séchées à l'air libre, à 20°C, pendant une heure, puis à l'étuve (105°C) pendant une demi-heure, puis à nouveau à l'air libre pendant 1 heure, avant d'être imprégnées.

Les conditions d'imprégnation, de dépôt des composés, et de développement sont décrites en détail dans l'ouvrage de COPIUS PEEREBOOM (1963). Nous indiquerons cependant brièvement le processus suivi. L'imprégnation a été réalisée en trempant les plaques dix secondes dans une solution d'undécane et de tétradécane dans l'éther de pétrole (12/3/85). La plaque était ensuite laissée à l'air libre une demi-heure. Le poids de la substance imprégnante représentait alors 0,55 g à 0,60 g par plaque. Un poids supérieur à 0,70 g entraînait inévitablement une mauvaise résolution. Les substances à analyser ont été déposées par points : 2 µl d'une solution à 10 p. 100 dans l'oxyde d'éthyle. Dans cette technique le solvant de développement était constitué par un mélange acide acétique, acétonitrile, eau (22,5/75/2,5).

b) *Chromatographie bidimensionnelle.*

Celle-ci (verticale et ascendante) n'a été utilisée qu'en système normal, sur des plaques 20 cm × 20 cm imprégnées de gel de silice G, dans les mêmes conditions que la chromatographie unidimensionnelle à l'exception des conditions de dépôt et de développement.

Les systèmes solvants ont été ceux utilisés par PENNOK et *al.*, en 1964 et plus récemment par WHITTLE et PENNOK (1967).

Premier solvant : chloroforme.

Deuxième solvant : 20 ou 30 p. 100 d'oxyde d'isopropyle dans l'éther de pétrole.

Le dépôt était effectué en un unique point situé à l'extrémité gauche de la plaque.

2. *Chromatographie sur colonne.*

Nous avons utilisé le fractionnement sur colonne de Florisil, selon EISNER et *al.* (1962). Le contrôle du fractionnement a été suivi par chromatographie sur couche mince. Nous décrirons rapidement le procédé utilisé.

a) *Préparation du Florisil.*

Celui-ci (150 g) a été chauffé à 260°C pendant 2 heures. Il a été ensuite placé dans un flacon bouché et refroidi dans un dessicateur. A 100 g de ce florisil versé dans un flacon de un litre 10 ml d'eau distillée ont été incorporés. Le flacon bouché a été agité fortement 10 à 15 minutes, et ensuite maintenu au repos durant douze heures.

b) *Préparation de la colonne.*

Dans une colonne (2,50 cm × 30,0 cm) aux trois quarts pleine d'hexane on a versé 30 g de Florisil traité. On a laissé l'hexane s'écouler jusqu'à environ 4 cm au-dessus du niveau de Florisil et on a ajouté 1,5 cm de sulfate de sodium anhydre. L'hexane était ensuite évacué jusqu'à ce qu'il atteigne le niveau supérieur du sulfate de sodium.

c) *Dépôt de l'insaponifiable.*

50 à 70 mg d'insaponifiable dissous dans 0,5 ml de chloroforme ont été alors versés sur la colonne.

d) *Élution.*

Celle-ci a été effectuée à l'aide d'hexane contenant une proportion croissante d'oxyde d'éthyle.

Des fractions de 5 ml ont été recueillies dans des tubes numérotés. Les solvants d'élution se sont succédés selon le schéma suivant :

tubes 1 à 8 : hexane ;
tubes 9 à 32 : hexane, oxyde d'éthyle (95/ 5) ;
tubes 33 à 62 : hexane, oxyde d'éthyle (85/15) ;
tubes 63 à 92 : hexane, oxyde d'éthyle (75/25) ;
tubes 93 à 120 : hexane, oxyde d'éthyle (50/50).

Le solvant contenu dans chaque tube était ensuite évaporé presque complètement, et une infime partie du contenu du tube était déposée sur une couche mince de silicagel G (Cf chromatographie sur couche mince unidimensionnelle, système normal). Le développement était assuré par le mélange solvant benzène, méthanol (100/1,8). Après examen des résultats de la chromatographie sur couche mince, les tubes étaient réunis en 6 ou 7 groupes et contenaient ainsi respectivement des composés possédant approximativement les mêmes Rf de migration.

3. *La chromatographie en phase gazeuse.*

Celle-ci a été utilisée comme moyen secondaire de fractionnement et non comme moyen primaire.

Nous avons analysé séparément quelques fractions recueillies après chromatographie sur colonne de l'insaponifiable total (dans les conditions décrites plus haut). Cette analyse a été réalisée avec un appareil Aerograph Hy Fi 600 D équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Un seul type de colonne a été utilisé au cours du travail rapporté dans la présente communication : colonne en acier inoxydable de 1,50 m de long (5 pieds anglais), de 0,3 cm de diamètre environ (1/8 de pouce anglais) remplie d'Aeropak 30, (100/120 mesh) imprégné de SE-52 au taux de 5 p. 100. Les températures de la colonne, de l'injecteur et du détecteur ont varié selon la nature des composés analysés. Le débit du gaz vecteur (azote) était généralement de l'ordre de 30 ml par minute.

C. — *Identification des composés*

Un certain nombre de composés témoins ont été utilisés.

Les témoins ont été le plus souvent acquis dans le commerce. On a utilisé des tocophérols purs (α, β, γ et δ), de la vitamine K_1, des stérols, des hydrocarbures (l'un saturé, le squalane, l'autre insaturé, le squalène), enfin un certain nombre d'alcools. Parmi les alcools témoins citons un alcool monohydrique à chaîne droite (saturé : alcool arachidique), un alcool à chaîne ramifiée (*d*-linaloolol ou *d*-3,7-diméthyl-1,6-octadiène-3-ol), et un alcool monohydrique cyclique (le lanostérol).

Dans quelques cas nous avons aussi utilisé des témoins préparés par nous-mêmes : cholestérol, phytostérols, esters de stérol, tocophérylquinones, etc.

Les essais d'identification des composés ont fait appel à diverses techniques.

1. *Spectrophotométrie ultraviolette.*

La présence d'un maximum d'absorption à une longueur d'onde définie peut constituer un critère d'identification.

Les spectres d'absorption de composés purs témoins, ou de composés recueillis lors des fractionnements ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman D. U., les composés étant dissous dans le cyclohexane.

2. *Spectrométrie infrarouge.*

Les composés témoins comme les diverses fractions recueillies lors des fractionnements ont été étudiés à l'état de films de moins de 0,025 mm d'épaisseur. On a utilisé un spectrophotomètre Perkin Elmer 21 à prisme de chlorure de sodium.

3. *Chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse.*

En chromatographie sur couche mince la similitude du Rf et en chromatographie en phase gazeuse la similitude du temps de rétention, toutes choses étant égales par ailleurs, créent une probabilité d'identité entre le composé témoin et le composé à identifier.

Cette méthode a été largement utilisée.

II. — RÉSULTATS

A. — *Obtention de l'insaponifiable*

Les teneurs en insaponifiable de diverses huiles et graisses sont présentées dans le tableau I.

Elles sont données à titre d'exemples et ont été obtenues après diverses déterminations sur un même échantillon d'huile ou de graisse.

TABLEAU I

Teneurs en insaponifiable de diverses huiles ou graisses
(exprimées en p. 100 de l'huile ou de la graisse)

Nature du produit	Teneur en insaponifiable
Huile de soja	0,56 ± 0,06
Margarine Planta	0,32 ± 0,02
Saindoux	0,14 — 0,19
Beurre	0,56 — 0,59
Suif	0,32 — 0,37

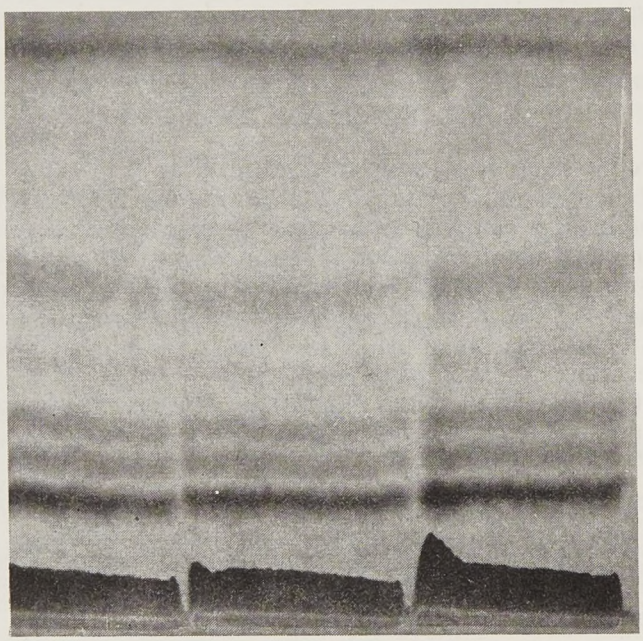


FIG. 2. — *Fractionnement d'un insaponifiable d'huile de soja obtenu par la méthode de* LEMELAND (*1923*)
Silicagel G : 0,3 mm d'épaisseur
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)
La tache inférieure est due à la présence d'acides gras libres.

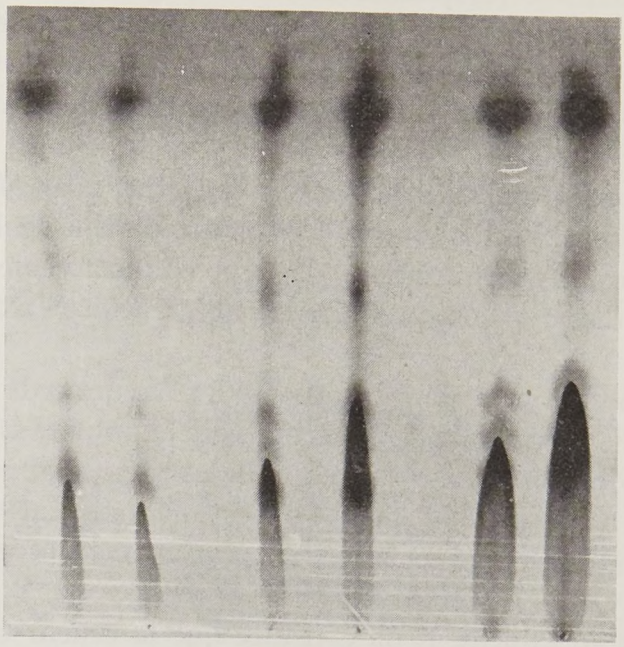


FIG. 3. — *Fractionnement d'insaponifiables de 3 margarines* (en double) *obtenus par la méthode de* LEMELAND (1923)
Silicagel G : 0,3 mm d'épaisseur
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)
Interférence de la tache inférieure due aux acides gras libres

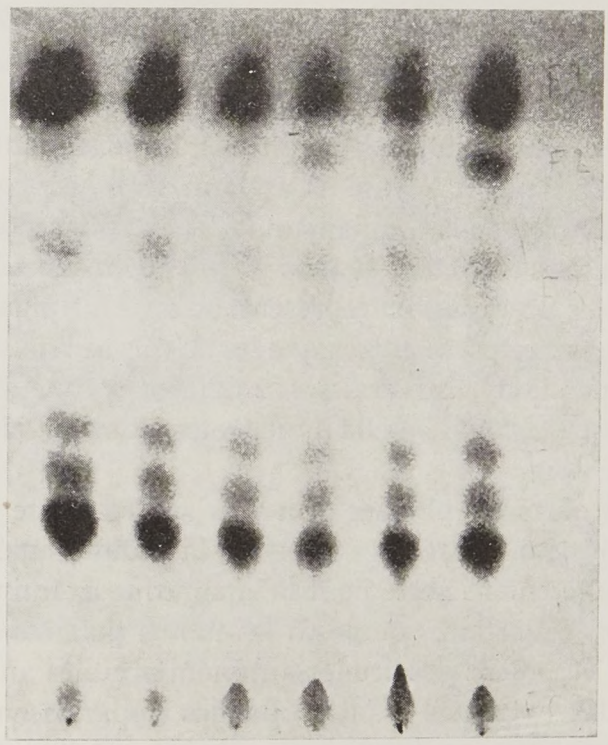


FIG. 4. — *Fractionnement d'un insaponifiable de margarine P obtenu par la méthode à l'oxyde d'éthyle*
Silicagel G : 0,3 mm d'épaisseur
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)
On n'observe pratiquement pas d'acides gras libres à la base du chromatogramme

Les teneurs en matière insaponifiable obtenues par la méthode de LEMELAND (1923) sont toujours supérieures à celles présentées dans le tableau 1.

L'analyse sur chromatoplaque des insaponifiables révèle que les différences observées sont dues à la présence d'acides gras libres dans l'extrait obtenu selon cette ancienne méthode.

Les figures 2, 3 et 4 sont très nettes sur ce point. C'est pourquoi nous avons abandonné définitivement la méthode de LEMELAND dont le seul avantage de ne pas entraîner d'émulsions, s'accompagnait de trop d'inconvénients. Des émulsions risquent cependant toujours de se produire lorsqu'on utilise l'oxyde d'éthyle comme solvant d'extraction.

En 1967, MORDRET a proposé d'incorporer de l'hydroxyde de potassium au gel de silice utilisé lors de la chromatographie sur couche mince, afin de réduire encore l'interférence des acides libres avec les composés les plus polaires de l'insaponifiable.

En ce qui concerne plus spécialement l'obtention quantitative de l'insaponifiable du beurre, la méthode récemment proposée par SCWARTZ et *al.* (1966) mériterait d'être expérimentée.

En se reportant au tableau 1, on constate que la teneur en insaponifiable, est relativement élevée pour le beurre et l'huile de soja. Elle est plus faible pour les échantillons de suif, et de margarine examinés. Le saindoux est, parmi les corps gras étudiés, celui qui contient le moins de matière insaponifiable.

B. — *Performances comparées des diverses techniques de fractionnement primaire de l'insaponifiable*

1. *Chromatographie sur couche mince.*

a) *Fractionnement simple.*

Les figures 2, 3 et 4 révèlent la présence de nombreux constituants dans les insaponifiables de l'huile de soja et des margarines végétales. Présentés comparativement et fractionnés dans les mêmes conditions, les insaponifiables de beurre et de graisses animales (suif, saindoux) (fig. 5) apparaissent beaucoup moins complexes. Cependant ce résultat peut n'être qu'apparent et provenir de ce que le cholestérol constitue dans les graisses animales, 80 à 90 p. 100 de l'insaponifiable, alors que dans le soja par exemple les phytostérols représentent tout au plus 50 p. 100 de la fraction insaponifiable. Les composés autres que les stérols se trouvent ainsi sur les chromatoplaques correspondant aux graisses animales à une concentration environ cinq fois plus faible que celle à laquelle ils se trouvent sur la chromatoplaque correspondant à l'huile de soja.

Sur les diverses chromatoplaques groupées sur la figure 5 la bande inférieure très marquée est constituée par les stérols et la bande supérieure plus ou moins intense, mais particulièrement nette pour la margarine examinée est constituée par des hydrocarbures et des esters, composés les moins polaires de l'insaponifiable.

Ces indications découlent des études antérieures citées au début de cette étude.

Entre ces bandes extrêmes d'autres bandes apparaissent. Celles-ci, en partie pour la raison que nous venons d'indiquer sont moins intenses pour les graisses animales que pour l'huile de soja ou la margarine examinée mais elles sont cependant bien visibles. Dans le cas du beurre par exemple, deux bandes surmontent les stérols et plusieurs autres bandes apparaissent dans la région voisine des hydrocarbures.

Ce sont précisément tous les constituants de ces bandes qui doivent être identifiés.

Mais il apparaît déjà qu'une étude des constituants de l'insaponifiable du beurre ne peut être fructueuse qu'après une élimination sélective du cholestérol. Une telle opération pourrait être réalisée par le procédé proposé par SCHWARTZ et *al.* (1967). Mais dans l'étude rapportée ici nous n'avons pas effectué cette élimination. C'est pourquoi nous avons continué notre investigation des méthodes et de leurs performances spécifiques, en faisant appel le plus souvent à l'insaponifiable de l'huile de soja.

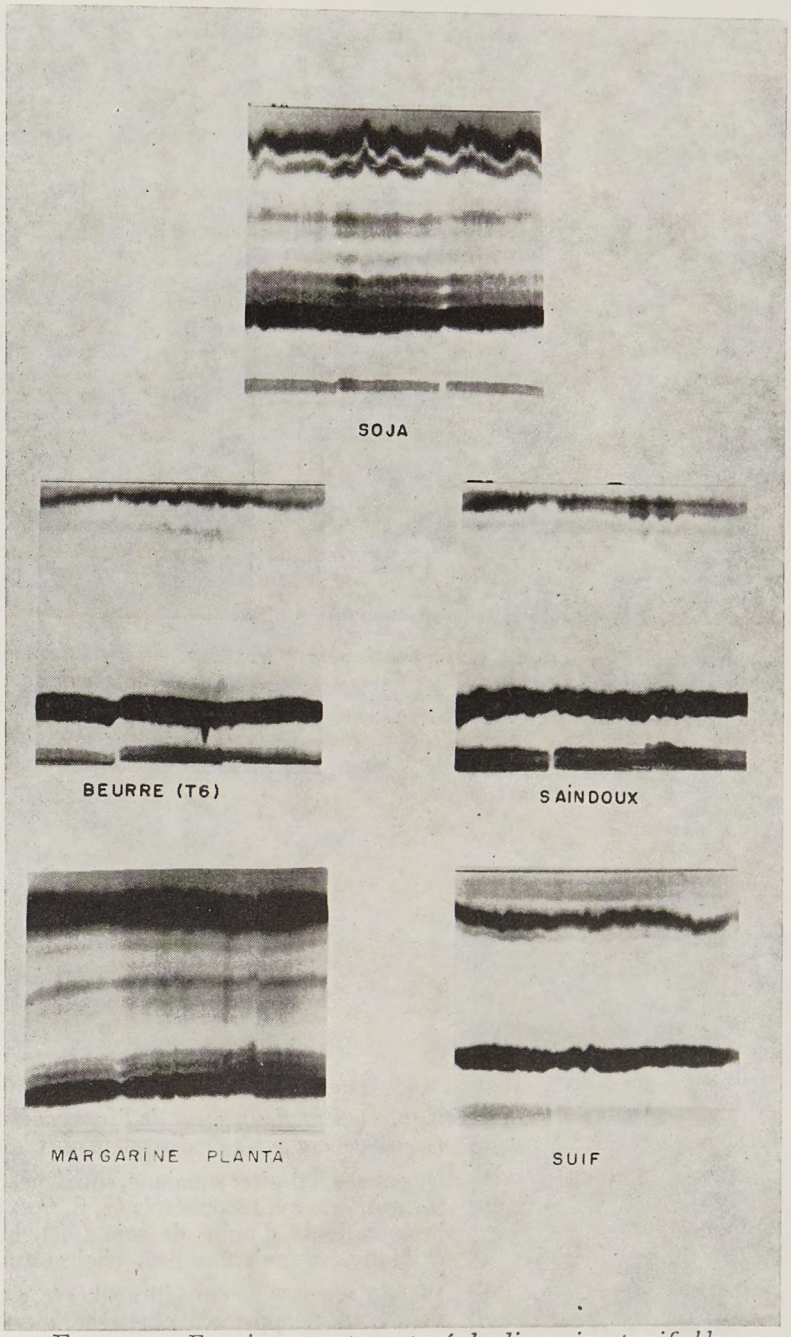


FIG. 5. — *Fractionnement comparé de divers insaponifiables* (mêmes conditions que sous figure 4)

La chromatographie sur couche mince utilisée dans les conditions indiquées sur les figures 2 à 5 (solvant : benzène contenant 1,8 p. 100 de méthanol) permet un fractionnement équilibré des constituants de l'insaponifiable qui apparaissent répartis en 7 ou 8 bandes (Cf. huile de soja) assez régulièrement espacées.

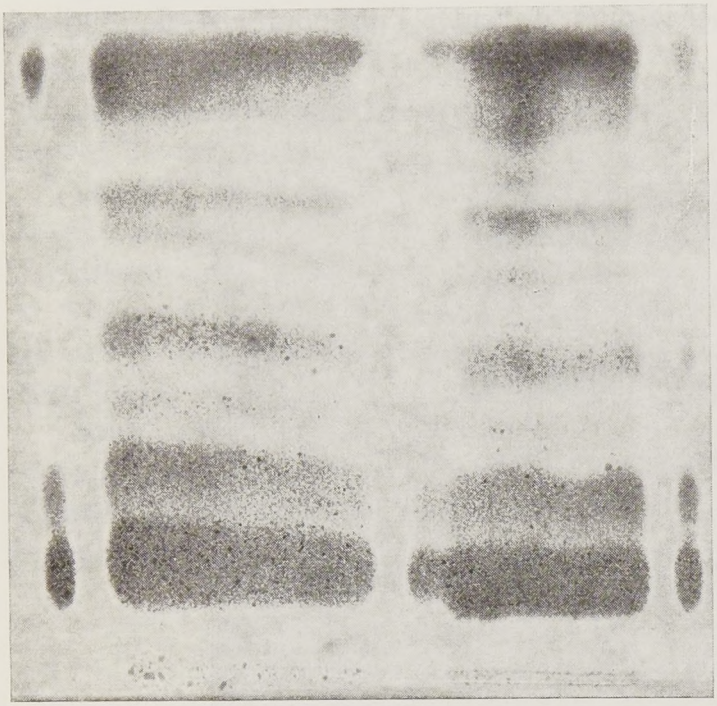


FIG. 6. — *Fractionnement de l'insaponifiable de l'huile de soja sur couche épaisse* (1 mm)
Solvant de développement : chloroforme

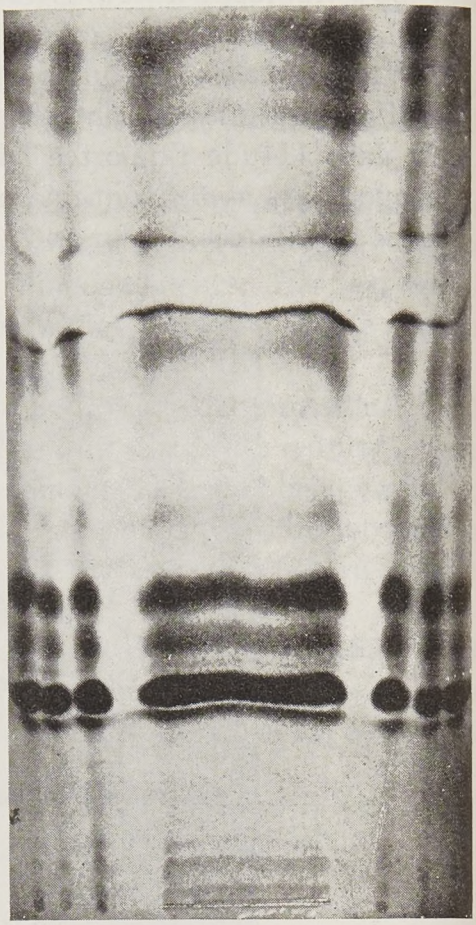


FIG. 7. — *Fractionnement de l'insaponifiable de l'huile de soja sur couche mince de silicagel G* (0,3 mm) *avec le système B. N. DESAGA modifié* (cf. fig. 1)

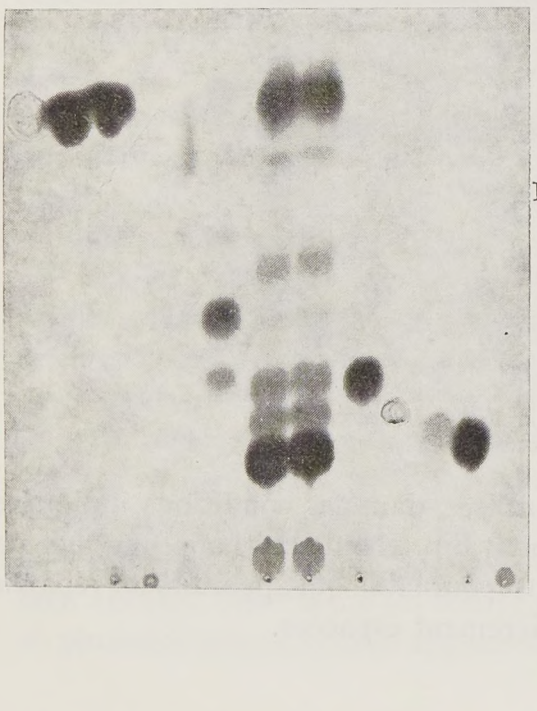


FIG. 8. — *Fractionnement de l'insaponifiable d'huile de soja et migration comparée de divers témoins*

De gauche à droite: squalane, squalène, oléate de cholestérol, β-carotène, cire, tocophérols (α, β, γ et δ), insaponifiable d'huile de soja (*bis*), lanostérol, alcool arachidique, 10-undecène-1-ol, cholestérol, 2-butène-1,4-diol.

Plaque 20 cm × 20 cm, silicagel G (0,3 mm d'épaisseur) solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8).

Un tel fractionnement pourrait donc être utilisé en vue d'une étude approfondie des constituants, après récupération des fractions. Mais notre expérience nous a montré que, pour présenter un réel intérêt, c'est-à-dire conduire à l'obtention de fractions pures et en quantités suffisantes, la chromatographie sur couche mince préparative exige l'utilisation d'un solvant simple, la possibilité d'effectuer des dépôts importants et une très bonne résolution des bandes.

Nous avons donc effectué des essais de chromatographie préparative en utilisant comme solvant de développement le chloroforme pur qui a une polarité à peu près équivalente à celle du mélange benzène, méthanol (100/1,8), et des plaques de 0,5 mm et de 1 mm d'épaisseur permettant des dépôts (linéaires) de l'ordre de 30 mg d'insaponifiable par plaque de 20 cm × 20 cm.

Afin d'éviter l'interférence des impuretés du gel, la plaque est développée « à vide » avant d'effectuer le dépôt.

Un exemple de fractionnement obtenu dans ces conditions est montré sur la figure 6.

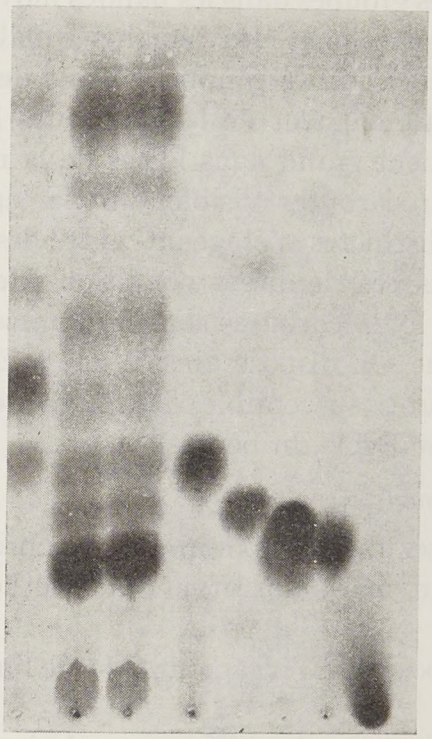


FIG. 9. — *Partie droite de la figure 8 après chauffage prolongé*

L'alcool arachidique se colore nettement par le réactif phosphomolybdique

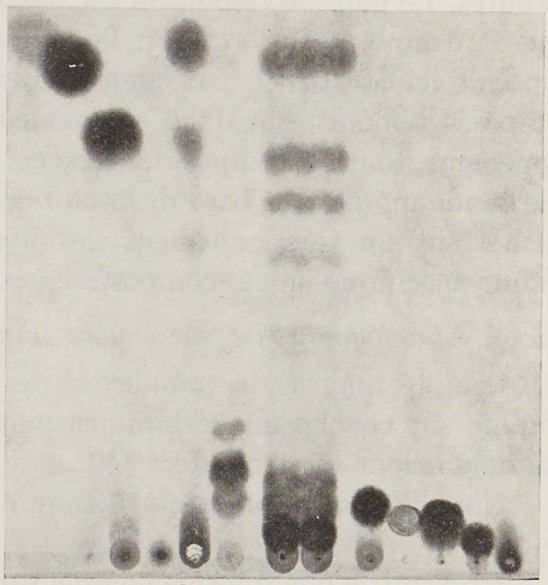


FIG. 10. — *Même légende que sous figure 8 mais solvant de développement différent*

Ici : hexane, oxyde d'éthyle (90/10)
On observe un comportement modifié des composés. L'ester de stérol se sépare des hydrocarbures. Ceux-ci amorcent un début de séparation

Si des dépôts relativement importants sont possibles, l'espacement des bandes reste à certains niveaux assez restreint. On a donc tenté d'accroître la résolution des bandes en augmentant la distance de migration. Pour cela, nous avons travaillé sur des plaques 20 cm × 40 cm, montées dans un système NB de DESAGA modifié (fig. 1). Le développement a été poursuivi selon la grande dimension de la plaque et le solvant a migré sur 35 cm environ.

Dans ces conditions l'espacement des bandes a été accru (fig. 7). Dans la

zone centrale l'espacement apparaît suffisant pour permettre une récupération de bandes sans craindre une contamination par des composés provenant des bandes voisines mais, dans la zone surmontant les stérols, et dans la zone des hydrocarbures de nouvelles bandes apparaissent restreignant les espaces vides. Toutefois, une récupération sélective des bandes obtenues dans ces conditions apparaît possible. Nous disposons ici d'une technique qui pourrait être utilisée lors de l'étude de l'insaponifiable du beurre puisque précisément les deux bandes majeures surmontant les stérols y ont été reconnues.

b) *Fractionnement par étapes.*

La chromatographie sur couche mince a été également utilisée d'une manière un peu différente de la manière décrite dans le paragraphe précédent. En faisant varier la polarité des solvants de développement, on a obtenu à partir d'un insaponifiable donné des images de fractionnement très différentes (fig. 8, 9 et 10).

Ainsi en utilisant un mélange hexane à 10 p. 100 d'oxyde d'éthyle (au lieu de benzène contenant 1,8 p. 100 de méthanol) on « ramasse » en quelque sorte les composés les plus polaires et on « dégage » les composés groupés dans les bandes moyennes. La zone des hydrocarbures (marquée par l'emplacement des témoins squalène et squalane) est dans ce cas peu amplifiée. Mais si on utilise comme solvant de développement de l'hexane pur on obtient un fractionnement de la bande des hydrocarbures. Le gain de résolution est particulièrement grand dans le cas de la margarine P examinée (fig. 11) où la bande d'hydrocarbures visible sur la figure 4 apparaît ici constituée par cinq bandes bien distinctes s'étageant entre les deux composés témoins (squalane et squalène). Dans ces dernières conditions de développement, tous les composés à l'exception des hydrocarbures sont « ramassés » en une bande unique à la base de la chromatoplaque. On dispose ainsi d'une technique permettant un fractionnement des hydrocarbures susceptible d'être utilisé pour l'étude spécifique de ces composés dans l'insaponifiable du beurre.

c) *Chromatographie sur couche mince bidimensionnelle.*

Compte tenu de la complexité des composés de l'insaponifiable, la chromatographie sur couche mince bidimensionnelle peut aussi constituer une méthode de fractionnement intéressante.

Nous l'avons appliquée à l'étude des composés de l'insaponifiable de l'huile de soja.

Utilisant le chloroforme comme premier solvant et le mélange oxyde isopropylique, éther de pétrole (20/80) comme deuxième solvant, nous avons obtenu des images de fractionnement intéressantes (fig. 12).

L'image obtenue à partir de l'insaponifiable de l'huile de soja est particulièrement riche. Si l'on disposait d'un insaponifiable de beurre débarrassé du cholestérol on obtiendrait dans ces mêmes conditions un excellent fractionnement des composés. On peut appliquer à la chromatographie sur couche mince bidimensionnelle le processus de fractionnement « par étapes » que nous avons détaillé plus haut et qui consisterait ici à modifier la nature du premier solvant.

On pourrait alors, du moins théoriquement, récupérer spécifiquement chaque tache isolée et analyser ensuite ses constituants. On a en effet toujours avantage à « fractionner » au maximum avant d' « analyser ». On diminue de cette façon les risques d'interférence des composés. Cependant, les essais que nous avons effectués

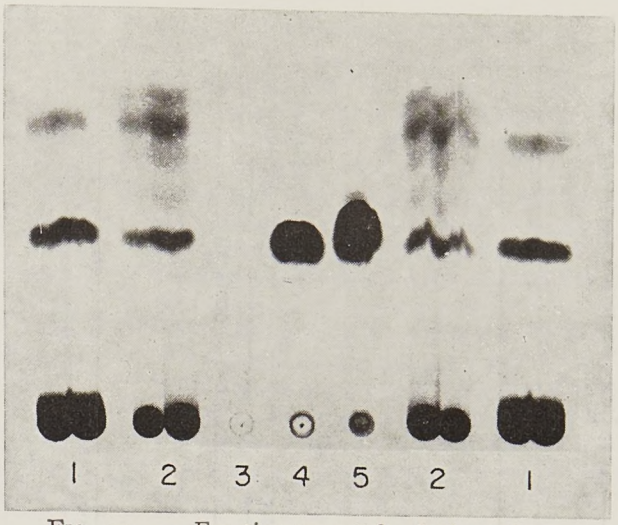


FIG. 11. — *Fractionnement des hydrocarbures*

Plaque 20 × 20 cm de silicagel G (0,3 mm d'épaisseur), solvant de développement : hexane. Huile de soja (1), insaponifiable de margarine (2), squalane (3), squalane et squalène (4), squalène (5).
Le squalane est à peine coloré par le réactif phosphomolybdique dans les conditions de la révélation

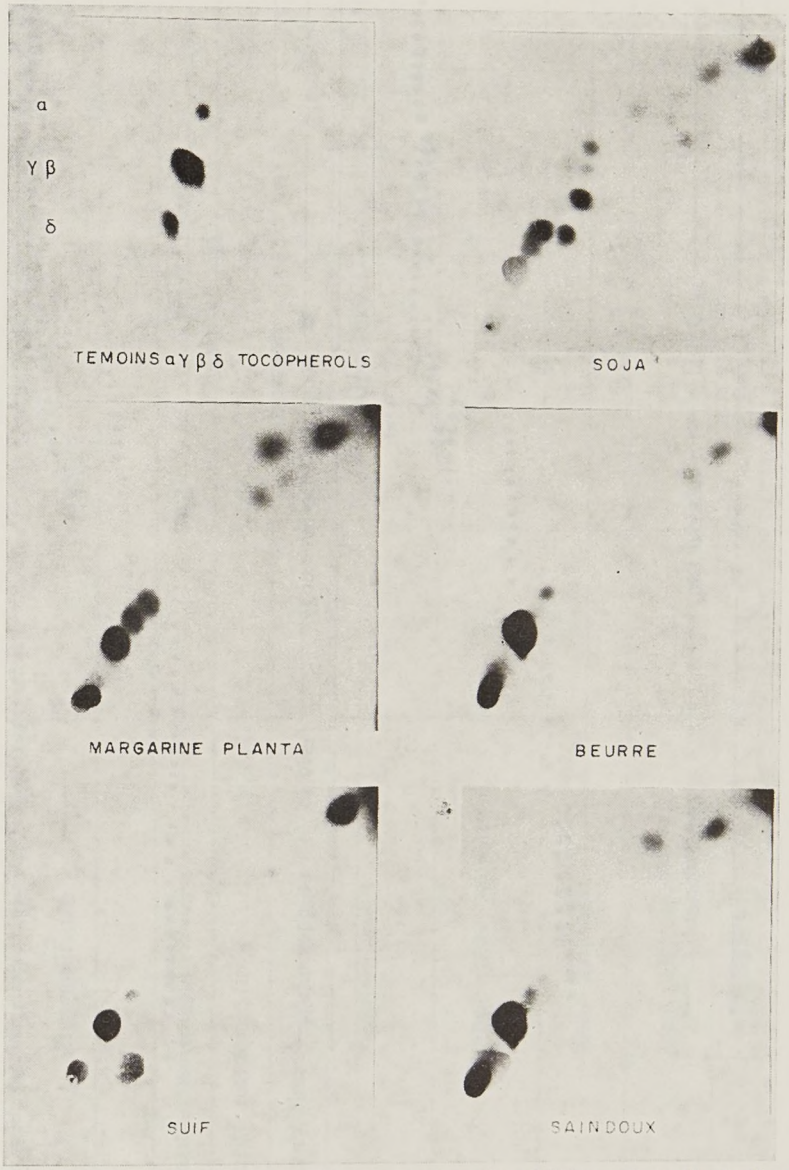


FIG. 12. — *Fractionnement par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle de divers insaponifiables*
Plaques de 20 × 20 cm, silicagel G (0,3 mm d'épaisseur)

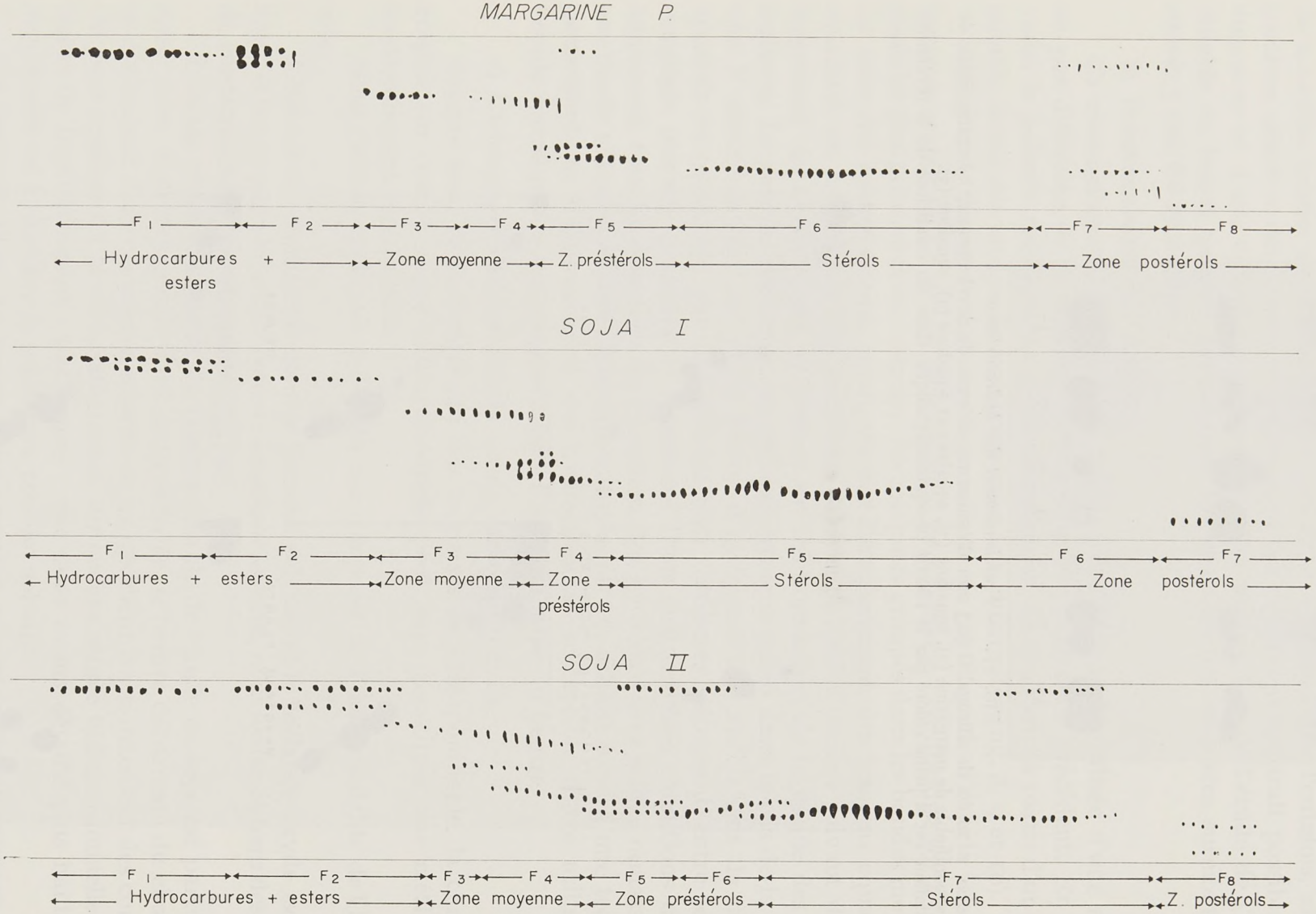


FIG. 13. — *Étude du fractionnement sur colonne de Florisil, d'un insaponifiable de margarine P et de deux insaponifiables obtenus à partir de la même huile de soja. Chaque dépôt correspond à une partie aliquote du contenu des tubes d'élution*

Les plaques ont été placées côte à côte pour obtenir une bonne représentation du fractionnement sur colonne.
On a, arbitrairement, divisé l'éluat total en autant de fractions que permettait de distinguer l'image du fractionnement.

On a, arbitrairement, divisé l'éluat total en autant de fractions que permettait de distinguer l'image du fractionnement.

TABLEAU 2

Fractionnement de l'insaponifiable sur colonne de Florisil

Insaponifiable	Margarine		Huile de soja			
			1		2	
Quantité mise (mg)	73,3		63,5		50,4	
Quantité retrouvée (mg)	72,2		65,8		56,3	
Récupération (%)	98,5		103,6		111,7	
Fractionnement	Fractions	P. 100 insaponifiable retrouvé	Fractions	P. 100 insaponifiable retrouvé	Fractions	% insaponifiable retrouvé
Zone hydrocarbures et esters	F_1 F_2	21 9	F_1 F_2	10 5	F_1 F_2	11 13
Zone moyenne	F_3 F_4	10 1	F_3	9	F_3 F_4	4 8
Zone pré-stérols	F_5	20	F_4	17	F_5 F_6	9 12
Stérols	F_6	33	F_5	46	F_7	41
Zone post-stérols	F_7 F_8	3 3	F_6 F_7	8 5	F_8	2

sur chromatographie bidimensionnelle préparative (dépôt important, couche de 1 mm), n'ont pas été concluants. Nous n'avons pas obtenu un fractionnement aussi satisfaisant qu'en chromatographie sur couche fine. Il se peut cependant que de nouveaux supports « gels de silice » spécialement conçus pour la chromatographie préparative, en couche épaisse permettent d'obtenir une aussi bonne résolution qu'en couche fine, offrant ainsi la meilleure solution au fractionnement des composés de l'insaponifiable du beurre.

2. *Chromatographie de partage sur colonne.*

On a appliqué la méthode de chromatographie sur colonne de EISNER et *al.* (1962) au fractionnement de trois insaponifiables. Deux insaponifiables ont été préparés à partir d'un même échantillon d'huile de soja et le troisième à partir d'un échantillon de margarine P. Le contenu de chacun des tubes ayant servi à recueillir l'éluat, a été examiné au moyen de la chromatographie sur couche mince. La figure 13 représente l'image du fractionnement des trois insaponifiables tel qu'il a été réellement observé.

On constate un chevauchement des composés dans la zone moyenne et un bon isolement des hydrocarbures de tête et des stérols. Le fractionnement sur colonne selon EISNER et *al.* (1962) constitue ainsi un moyen relativement simple d'obtenir les stérols à l'état pur.

Malgré l'imperfection du fractionnement on a rassemblé les tubes dont le contenu correspondait à des composés de Rf voisin. On a ainsi obtenu plusieurs groupes de tubes réunissant les éluats respectivement pour chaque groupe, et on a abouti aux fractions numérotées à la base des chromatoplaques (fig. 13). Le nombre de fractions (7 ou 8) a varié en fonction de l'allure du fractionnement. Les stérols se sont ainsi trouvés réunis dans la fraction F_6 pour l'insaponifiable de la margarine analysée et dans les fractions F_5 et F_7 respectivement pour les deux insaponifiables de l'huile de soja.

Dans le tableau 2, nous avons porté les résultats pondéraux du fractionnement sur colonne.

Dans les cas des insaponifiables de la margarine P et de l'échantillon 1 de l'huile de soja (S_1) on a obtenu un pourcentage de récupération des produits mis sur colonne tout à fait acceptable. Dans le cas de l'échantillon 2 de l'huile de soja (S_2), le pourcentage de récupération est excessif et dénote une contamination au cours du fractionnement mais on relève sur la figure 13, pour l'insaponifiable S_2, des taches de composés très peu polaires qui apparaissent à la partie supérieure des chromatoplaques au niveau des fractions F_5 et F_6 et sans doute aussi de la fraction F_2, précisément là où les pourcentages des composés sont dans l'insaponifiable S_2 supérieurs aux pourcentages trouvés pour les mêmes composés dans l'insaponifiable S_1.

Si l'on compare cependant les fractions correspondant à des composés semblables dans l'un (S_1) et l'autre (S_2) insaponifiables, et relativement bien isolés, on obtient des résultats assez concordants. Les stérols représentent 45 à 50 p. 100 du poids de l'insaponifiable, les composés de la zone « pré-stérols » (F_4 de S_1 comparée aux fractions $F_5 + F_6$ de S_2) représentent 16 à 20 p. 100 et les composés de la zone moyenne (F_3 de S_1 comparée aux fractions $F_3 + F_4$ de S_2) environ 10 p. 100.

Les fractions de tête ($F_1 + F_2$), constituent un groupe pondéralement assez

important dans l'insaponifiable de soja, voisin de 15 p. 100. Il apparaît ici nettement que ce même groupe, constitué par des composés qui se placent au niveau des hydrocarbures, est, dans l'insaponifiable de la margarine examinée, nettement plus important. Il représente en effet près de 30 p. 100 du poids total de l'insaponifiable. Cette richesse en ces composés de tête apparaissait déjà dans les images de fractionnement sur couche mince présentées dans le paragraphe précédent.

Il existe une différence entre les insaponifiables S_1 et S_2 de l'huile de soja. Celle-ci concerne la zone post-stérols. Pour S_1 elle est importante (13 p. 100) pour S_2 elle est presqu'inexistante (1,8 p. 100). Quelle est l'origine de cette différence ?

L'insaponifiable S_1 a été préparé à partir de 8,9 g d'huile. On a obtenu 63,5 mg d'insaponifiable soit 0,7 p. 100, ce qui constitue un pourcentage excessif.

Le fort pourcentage de l'insaponifiable S_1 pourrait s'expliquer par la présence de lipides incomplètement saponifiés ; cependant les lipides simples tels que les cérides souvent difficiles à saponifier sont des composés très peu polaires qui migrent à la partie supérieure des chromatoplaques. Il ne pourrait donc s'agir que de lipides complexes (possédant un groupement polaire) qui auraient été soit complètement hydrolysés au cours de la saponification conduisant à l'insaponifiable S_2, soit non extraits.

Le peu d'efficacité du fractionnement sur colonne des constituants de l'insaponifiable ressort de l'analyse par chromatographie sur couche mince des diverses fractions éluées. A l'exception des fractions contenant les stérols on trouve dans toutes les autres fractions un mélange de composés de Rf voisin certes, mais cependant différent, conséquence des chevauchements observés au cours de l'élution.

L'utilisation de la chromatographie sur couche mince bidimensionnelle, démontre plus nettement encore la complexité de certaines fractions recueillies.

Sur la figure 14 nous avons représenté la chromatoplaque obtenue en chromatographie bidimensionnelle à partir de la fraction F_2 de l'insaponifiable de l'huile de soja (2). De l'α-tocophérol a été ajouté afin de situer les composés. Ceux-ci appartiennent bien à la partie supérieure de la zone moyenne puisqu'ils se situent au-dessus de l'α-tocophérol, mais leur nombre est élevé. Sur la figure 15, nous avons représenté la chromatoplaque obtenue à partir de la fraction F_4 (soja 2). Sur la figure 16 une autre chromatoplaque obtenue à partir de la même fraction additionnée d'α-tocophérol.

Cette fraction F_4 (soja 2) ne contient pas de stérol. Cela a été démontré au cours de l'analyse par chromatographie sur couche mince unidimensionnelle. La tache inférieure appartient à la zone des alcools, alors que la tache supérieure représente les constituants qui se placent en chromatographie unidimensionnelle un peu au-dessous de l'α-tocophérol. Il y a donc eu interférence entre la « zone moyenne » et la zone « pré-stérols ». Cette interférence est particulièrement accentuée dans le cas de l'insaponifiable S_2 de l'huile de soja, mais elle existe aussi, comme cela est visible sur la figure 13, pour les autres insaponifiables fractionnés. Ainsi le fractionnement sur colonne utilisé seul ne constitue pas une bonne méthode d'étude des constituants de l'insaponifiable, car l'avantage de disposer sans trop de difficultés de poids relativement importants de composés ne compense pas l'inconvénient d'obtenir en fin de compte et à de rares exceptions près (cas des stérols par exemple) des mélanges de composés de nature différente.

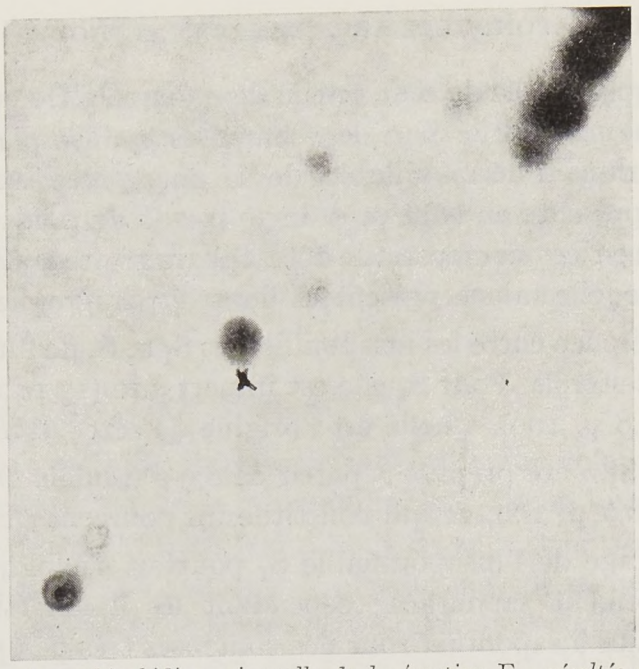


FIG. 14. — *Chromatographie bidimensionnelle de la fraction* F_2, *récoltée après fractionnement sur colonne de l'insaponifiable* (2) *de l'huile de soja. De l'*α*-tocophérol a été ajouté* (×)

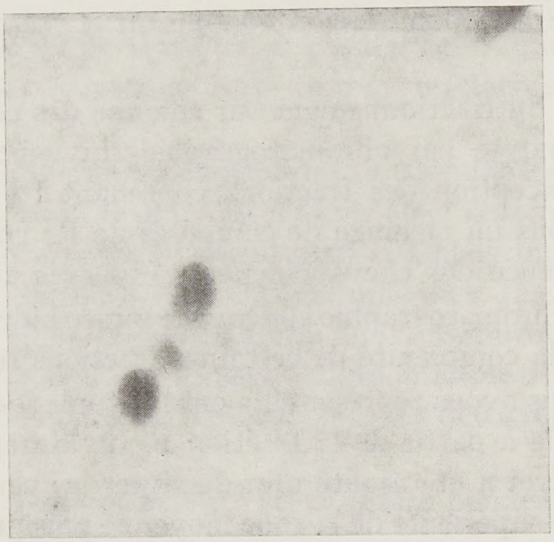


FIG. 15. — *Chromatographie bidimensionnelle de la fraction* F^4 *récoltée après fractionnement sur colonne de l'insaponifiable* (2) *de l'huile de soja*

FIG. 16. — *Chromatographie bidimensionnelle de la fraction* F4 (cf. fig. 15) *additionnée d'*α*-tocophérol* (×)

Par contre, l'intérêt du fractionnement sur colonne se trouve accru s'il est utilisé conjointement avec la chromatographie sur couche mince bidimensionnelle. En effet, puisqu'il s'agit de fractionner des composés dont les Rf sont voisins, il est possible — en choisissant les systèmes solvants de telle façon que la surface de la chromatoplaque soit bien utilisée — d'accroître considérablement la résolution du fractionnement.

Mais dans le travail présenté, l'étude des constituants sera poursuivie en utilisant les fractions telles qu'elles ont été obtenues après chromatographie sur colonne de l'insaponifiable total.

C. — *Reconnaissance des composés*

Afin de préparer l'étude ultérieure sur les composés de l'insaponifiable du beurre, nous avons voulu préciser les emplacements respectifs des composés de l'insaponifiable dans les différentes conditions chromatographiques utilisées.

Si les emplacements respectifs des stérols (composés majeurs) et des hydrocarbures (composés les moins polaires, élués en tête) ne posent pas de problèmes, il n'en est pas de même des différents composés de la zone « moyenne » et des zones pré- et post-stérols.

Nous avons donc confronté les résultats obtenus par l'analyse spectrophotométrique en ultraviolet et en infrarouge des fractions recueillies après le fractionnement sur colonne, avec les données fournies par l'étude du comportement des composés témoins en chromatographie sur couche mince.

1. *Spectrophotométrie en ultraviolet.*

Les spectres d'absorption dans l'ultraviolet des fractions recueillies au cours du fractionnement sur colonne des insaponifiables de la margarine P et de l'huile de soja (1 et 2), et correspondant à la zone « hydrocarbures et esters » et à la zone « moyenne », ont été étudiés de 200 à 350 nm.

L'aspect qualitatif a été seul envisagé.

Les inflexions (ou les maximum) vers 235 et 260 nm peuvent être dues à la présence d'hydrocarbures (Cf. MERVYN et MORTON, 1959). Précisément un maximum d'absorption est observé à 235 nm dans les fractions F_1 (S_1 et S_2) de l'insaponifiable de l'huile de soja. (Les fractions F_1 et F_2 de l'insaponifiable de la margarine n'ont pas été étudiées dans l'ultraviolet).

Des inflexions à 235 nm et 260 nm sont encore visibles dans les fractions F_2 et F_3 (S_1 et S_2) de l'insaponifiable de l'huile de soja, et dans la fraction F_3 de l'insaponifiable de la margarine P. Mais, alors que les fractions F_1 ne présentaient aucune absorption vers 290 nm, les fractions F_2 et F_3 (soja 1), F_2, F_3 et F_4 (soja 2), F_3 et F_4 (margarine) sont toutes caractérisées par une nette absorption vers 290 nm. Celle-ci peut être attribuée à la présence de tocophérols dont les divers types ne peuvent pas être différenciés par l'étude du spectre ultraviolet. La chromatographie sur couche mince par contre permet cette différenciation (Cf. fig. 8 et 9).

Ainsi, la spectrophotométrie dans l'ultraviolet, dans les conditions où elle est utilisée dans la présente étude, apporte relativement peu en ce qui concerne l'identification des composés.

2. *Spectrométrie infrarouge.*

Un certain nombre de spectres infrarouges ont été obtenus à partir des fractions recueillies au cours du fractionnement sur colonne des insaponifiables de l'huile de soja (1 et 2) et de la margarine examinée (Cf. fig. 13).

Les spectres des fractions F_1 se rapprochent à des spectres d'hydrocarbures. On peut affirmer la présence d'hydrocarbures à longue chaîne, saturés, ramifiés et insaturés. Une absorption très faible à 5,8 μm est décelée dans ces fractions. Mais la bande ester est plus accentuée dans les fractions suivantes (F_2). Des esters de stérols ou, plus sûrement, des cérides souvent difficiles à hydrolyser se trouveraient sans doute présents à ce niveau.

On constate dans les fractions F_2, tant pour l'insaponifiable de la margarine que pour celui de l'huile de soja, la présence de bandes d'absorption également observées dans les spectres infrarouges des tocophérols témoins. On peut donc penser que l'α-tocophérol (le moins polaire des tocophérols) est partiellement élué à ce niveau, ce qui confirme les données fournies par l'étude du spectre ultraviolet des fractions F_2. L'élution des tocophérols se poursuit dans les fractions suivantes.

Une bande *trans* (10,36 μm) très nette est observée dans les fractions F_2 et F_3 de l'insaponifiable de la margarine, alors qu'on n'observe qu'une très faible bande *trans* dans la fraction F_2 de l'insaponifiable de l'huile de soja (soja 1). Les fractions F_5 (margarine), F_4 (soja 1), F_5 et F_4 (soja 2) sont uniformément caractérisées par une forte absorption vers 3 μm. Ces fractions correspondent à la zone « pré-stérols » et contiennent essentiellement des alcools : alcools aliphatiques à longue chaîne, saturés, insaturés et ramifiés et sans doute aussi cycliques.

Le groupe des stérols n'a pas été étudié par spectrophotométrie infrarouge.

Nous avons obtenu un spectre à partir d'une fraction de la zone « post-stérols » : il correspond à la zone F_6 de l'insaponifiable de l'huile de soja (soja 1) (fig. 17). Les composés présents à ce niveau mal révélés peuvent être soit des lipides complexes non hydrolysés soit des composés très polaires (dihydroxylés, cétoniques, etc.). L'examen du spectre ne nous a pas permis de caractériser le ou les composés constituant cette fraction polaire. Par ailleurs, (fig. 17) nous avons été frappés par la similitude qui existe entre le spectre infrarouge des composés de la zone post-stérols recueillie à partir de l'insaponifiable (1) de l'huile de soja et le spectre infrarouge obtenu à partir d'un extrait alcoolique de la caséine de lait de femme (travaux non publiés poursuivis en collaboration avec Ch. Alais). Dans ce dernier cas cependant l'absorption à 3 μm n'existe pas et les lipides ne sont pas polaires.

Malgré ces différences, il peut s'agir de composés de nature voisine.

L'utilisation de la spectrométrie infrarouge, dans les conditions décrites ici n'apporte qu'une aide limitée à l'identification des composés de l'insaponifiable. La présence de composés de nature différente dans une même fraction limite considérablement la portée de l'analyse.

3. *Chromatographie sur couche mince.*

Les informations les plus nombreuses concernant le « repérage » des composés ont été obtenues par la technique de chromatographie sur couche mince.

a) *Zone des hydrocarbures et des esters et zone moyenne.*

Prenant comme témoins le squalane et le squalène, nous avons montré qu'en

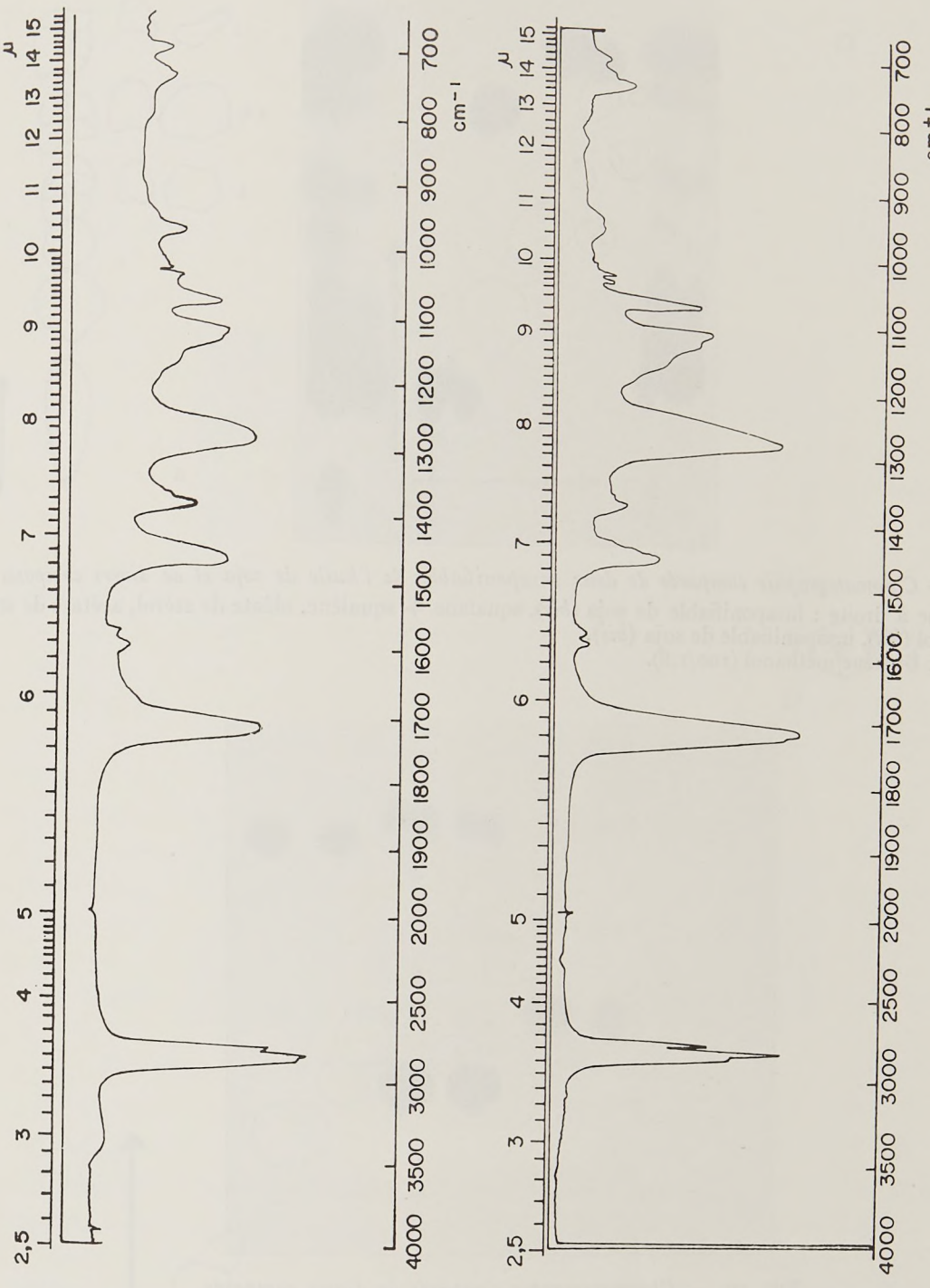


FIG. 17. — *Étude comparée des spectres IR, obtenus à partir de la fraction* F_6 *de l'insaponifiable* (I) *de l'huile de soja* (en haut) *et à partir de l'extrait alcoolique de la caséine de lait de femme préparée par* C. ALAIS (en bas)

système unidimensionnel normal, et dans le cas où le solvant de développement est le mélange benzène, méthanol (100/1,8), les esters les moins polaires (esters à longue chaîne tel l'oléate de cholestérol) se placent au même niveau que les hydrocarbures

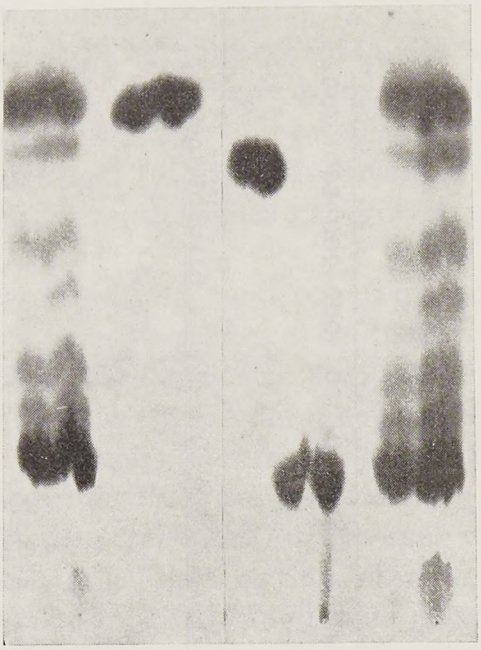


FIG. 18. — *Chromatographie comparée de deux insaponifiables de l'huile de soja et de divers composés*
De gauche à droite : insaponifiable de soja (*bis*), squalane + squalène, oléate de stérol, acétate de stérol cholestérol (*bis*), insaponifiable de soja (*bis*).
Solvant : benzène/méthanol (100/1,8).

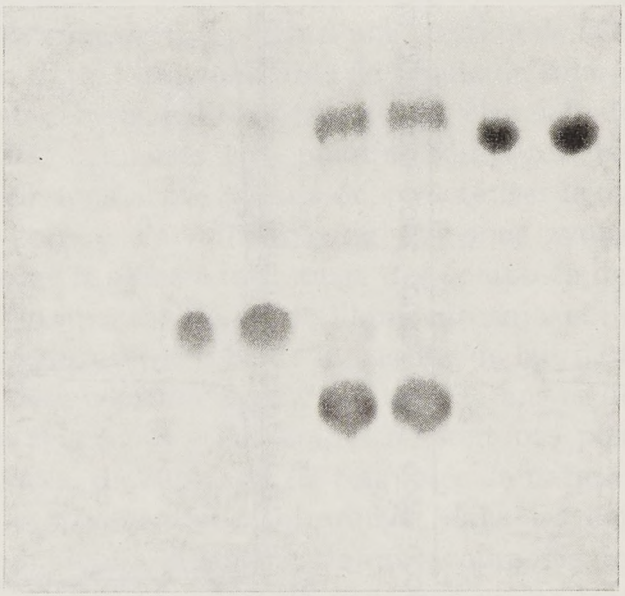


FIG. 19. — *Chromatographie comparée de divers composés*
De gauche à droite : α-tocophérol quinone (*bis*), insaponifiable de l'huile de soja (*bis*) vitamine K_1 (*bis*)
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)

(fig. 18). Toutefois les esters les plus polaires (acétates de stérols par exemple) se placent à un niveau légèrement inférieur.

Dans les conditions habituelles de chromatographie sur couche mince, c'est-à-dire en utilisant comme solvant de développement le mélange benzène, méthanol

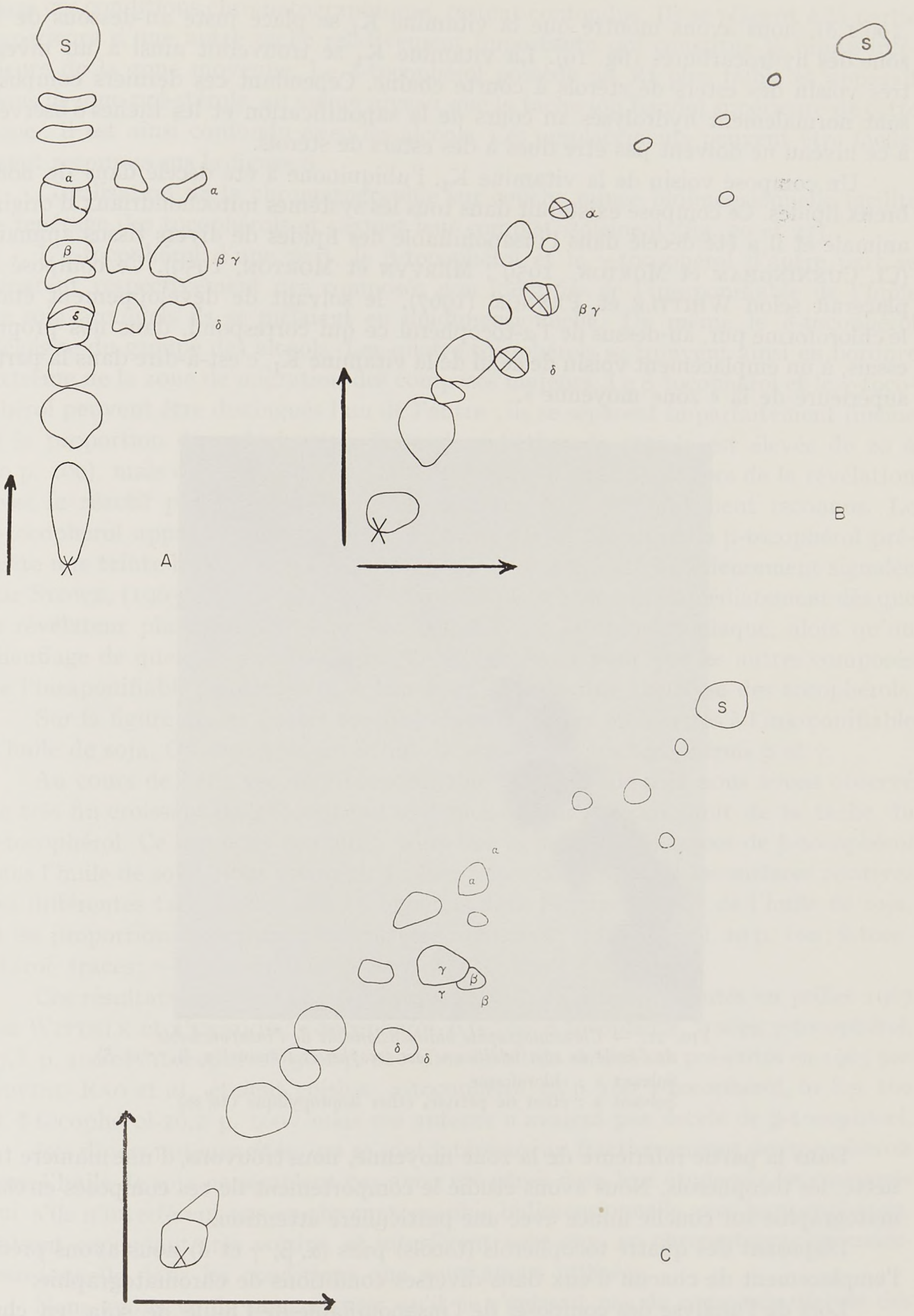


FIG. 20. — *Reproduction par photocopie de plaques chromatographiques obtenues dans différentes conditions, à partir de l'insaponifiable de l'huile de soja additionné de composés témoins* (squalame, squalène, α, β, γ et δ-tocophérols).

A : chromatographie unidimensionnelle ; solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8).
B et C : chromatographie bidimensionnelle ; solvant 1 : chloroforme, solvant 2 : éther de pétrole, éther isopropylique (80/20 pour B et 70/30 pour C).

100/1,8), nous avons montré que la vitamine K_1 se place juste au-dessous de la zone des hydrocarbures (fig. 19). La vitamine K_1 se trouverait ainsi à un niveau très voisin des esters de stérols à courte chaîne. Cependant ces derniers composés sont normalement hydrolysés au cours de la saponification et les taches observées à ce niveau ne doivent pas être dues à des esters de stérols.

Un composé voisin de la vitamine K_1, l'ubiquinone a été décelé dans de nombreux lipides. Ce composé existerait dans tous les systèmes mitochondriaux d'origine animale et il a été décelé dans l'insaponifiable des lipides de divers tissus animaux (Cf. CUNNINGHAM et MORTON, 1959 ; MERVYN et MORTON, 1959). Ce composé se placerait selon WHITTLE et PENNOK (1967), le solvant de développement étant le chloroforme pur, au-dessus de l'α-tocophérol ce qui correspond, dans nos propres essais, à un emplacement voisin de celui de la vitamine K_1, c'est-à-dire dans la partie supérieure de la « zone moyenne ».

FIG. 21. — *Chromatographie bidimensionnelle de l'insaponifiable de l'huile de soja additionné des tocophérols témoins* (α, β, γ et δ)
Solvant 1 : chloroforme
Solvant 2 : éther de pétrole, éther isopropylique (70/30)

Dans la partie inférieure de la zone moyenne, nous trouvons, d'une manière très nette, les tocophérols. Nous avons étudié le comportement de ces composés en chromatographie sur couche mince avec une particulière attention.

Disposant des quatre tocophérols (tocols) purs (α, β, γ et δ) nous avons précisé l'emplacement de chacun d'eux dans diverses conditions de chromatographie.

Lors de l'analyse des composés de l'insaponifiable de l'huile de soja, en chromatographie unidimensionnelle avec comme solvant de développement le mélange benzène, méthanol (100/1,8), l'α-tocophérol se place juste au-dessus d'une tache située à la partie inférieure de la zone moyenne. En dessous de cette tache (dont les constituants nous sont inconnus) se placent le β-tocophérol et le γ-tocophérol qui,

dans ces conditions chromatographiques, restent confondus. Ils se placent à la partie supérieure d'une autre tache relativement importante qui constitue la limite inférieure de la zone moyenne. Le δ-tocophérol possède un Rf plus faible et apparaît dans la zone pré-stérols, au même niveau que la tache (ou bande) supérieure de cette zone ; il est ainsi confondu avec les alcools. Ces emplacements peuvent être facilement reconnus sur la figure 8.

L'utilisation de la chromatographie sur couche mince bidimensionnelle facilite le repérage des tocophérols et permet leur complet isolement (fig. 20 et 21).

L'α-tocophérol d'une part, le β-tocophérol et le γ-tocophérol d'autre part se séparent respectivement des composés non identifiés de l'insaponifiable de l'huile de soja auxquels ils se mêlaient en unidimensionnelle. De même le δ-tocophérol s'éloigne du groupe des alcools. Les quatre tocophérols se trouvent ainsi en bordure extrême de la zone de migration des composés majeurs. Le β-tocophérol et le γ-tocophérol peuvent être distingués l'un de l'autre : ils se séparent imparfaitement (même si la proportion d'oxyde isopropylique dans l'éther de pétrole est élevée de 20 à 30 p. 100), mais du fait de la teinte différente qu'ils présentent lors de la révélation avec le réactif phosphomolybdique ils peuvent être spécifiquement reconnus. Le γ-tocophérol apparaît sous forme d'une tache bleue, alors que le β-tocophérol présente une teinte brun-rouge. Cette différence de teinte a été antérieurement signalée par STOWE, (1963). Précisons que les tocophérols se colorent immédiatement dès que le révélateur phosphomolybdique est dispersé sur la chromatoplaque, alors qu'un chauffage de quelques minutes à 105°C est nécessaire pour que les autres composés de l'insaponifiable apparaissent à leur tour. Ceci facilite l'analyse des tocophérols.

Sur la figure 21, les quatre tocophérols témoins ont été ajoutés à l'insaponifiable d'huile de soja. On distingue un début de séparation des tocophérols β et γ.

Au cours de l'analyse de l'insaponifiable de l'huile de soja nous avons observé un très fin croissant de β-tocophérol se détachant sur le bord droit de la tache du γ-tocophérol. Ce qui nous conduit à admettre la présence de traces de β-tocophérol dans l'huile de soja. Nous avons pu évaluer approximativement les surfaces relatives des différentes taches dues aux tocophérols dans l'insaponifiable de l'huile de soja, et les proportions suivantes peuvent être indiquées : α-tocophérol, 10 p. 100 ; β-tocophérol, traces ; γ-tocophérol, 60 p. 100 ; δ-tocophérol, 30 p. 100.

Ces résultats concordent avec les résultats plus précis présentés en juillet 1967 par WITTHLE et PENNOOK : α-tocophérol, 6 p. 100; β-tocophérol, traces; γ-tocophérol, 57,8 p. 100 et δ-tocophérol, 36,2 p. 100. Les résultats antérieurs présentés en 1965 par GOVIND RAO et *al.*, étaient voisins : α-tocophérol, 12 p. 100; γ-tocophérol, 61,8 p. 100 et δ-tocophérol-26,2 p. 100 ; mais ces auteurs n'avaient pas décelé de β-tocophérol.

Les divers auteurs cités, qui se sont intéressés au fractionnement des tocophérols dans l'huile de soja ne semblent pas avoir été gênés dans leur étude par les composés qui, s'ils n'interfèrent pas en chromatographie bidimensionnelle avec les tocophérols, en sont cependant très voisins, et interfèrent avec eux, en chromatographie unidimensionnelle dans les conditions que nous avons utilisées.

Nous avons voulu nous assurer qu'il ne s'agissait pas de composés dérivés des tocophérols, formés au cours de la saponification ou par suite d'une oxydation. Nous avons donc fait subir aux tocophérols témoins le traitement de saponification, tel qu'il est utilisé avant l'extraction de l'insaponifiable. Ce traitement n'a pas modifié le comportement chromatographique des tocophérols (fig. 22). Nous avons, par

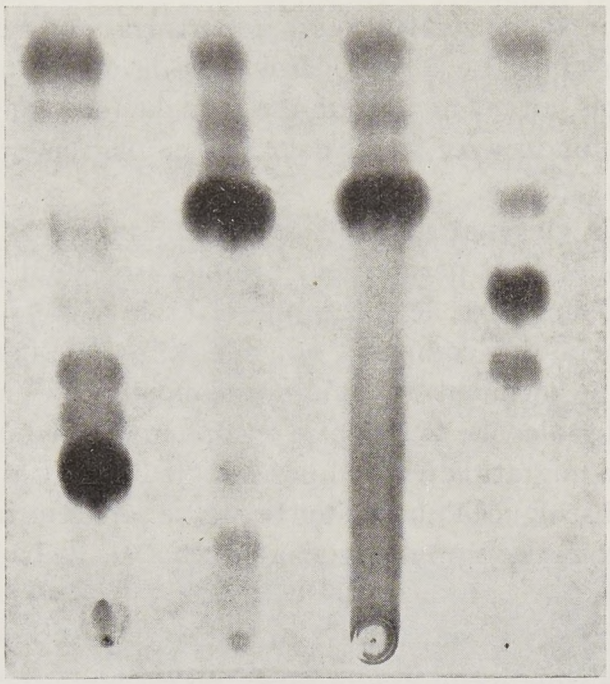


FIG. 22. — *Comportement chromatographique de l'α-tocophérol après traitement de saponification*
De gauche à droite : inspaonifiable d'huile de soja, α-tocophérol après traitement (*bis*), α,β,γ et δ-tocophérols
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)

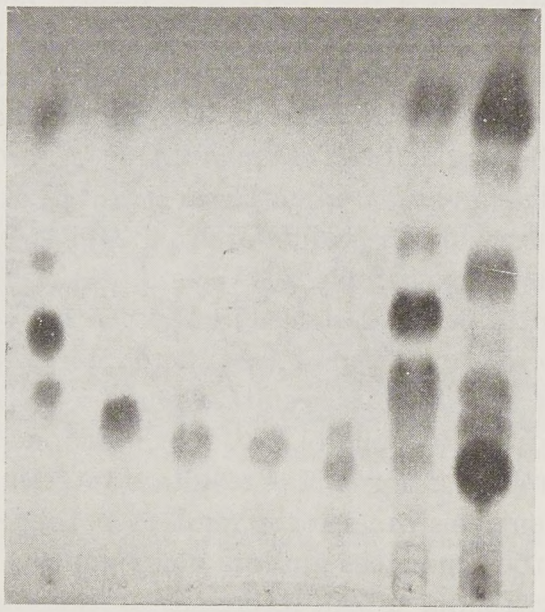


FIG. 23. — *Etude comparée des Rf de migration des tocophérols et de leurs produits d'oxydation* (tocophérol quinones)
De gauche à droite : α, β, γ et δ-tocophérols ; α-tocophérol quinone ; β-tocophérol-quinone ; γ -tocophérol-quinone ; δ-tocophérol-quinone ; α, β, γ et δ-tocophérols et α, β, γ et δ-tocophérol-quinones; insaponifiable d'huile de soja.
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8).

ailleurs, oxydé les tocophérols témoins en les plaçant pendant 12 heures en contact avec une solution méthanolique de nitrate d'argent (5 p. 100 de nitrate d'argent dans le méthanol à 90 p. 100). On a ainsi obtenu des tocophérols-quinones ; dans les conditions habituelles (solvant : benzène, méthanol, 100/1,8) les Rf de migration de ces

composés se sont révélés nettement inférieurs à ceux des tocophérols, et la diminution relative du Rf entre le tocophérol et le tocophérol quinone correspondant est restée uniforme dans tous les cas (fig. 23).

Les composés voisins des tocophérols (tocols) qui apparaissent dans une chromatographie sur couche mince de l'insaponifiable de soja ne sont pas non plus des tocophérols-tocotriénols puisque d'une part ces composés possèdent en chromatographie unidimensionnelle le même Rf de migration que les tocophérols-tocols (WHITTLE et PENNOCK, 1967), et que, d'autre part, ces tocophérols-tocotriénols n'ont pas été trouvés précédemment dans l'huile de soja.

Si l'on se réfère à l'image présentée par WHITTLE et PENNOCK (1967), la tache qui dans notre étude se place à la base de l'α-tocophérol, pourrait correspondre à du plastochromanol, mais ce ne peut être là qu'une supposition.

Nous n'avons pas développé davantage l'étude des composés susceptibles de se placer dans la partie inférieure de la zone moyenne et nous abordons maintenant l'étude de la zone pré-stérols (fig. 13).

b) *Zone pré-stérols.*

Dans les conditions chromatographiques habituelles — unidimensionnelle, solvant benzène-méthanol (100/1,8) — cette zone est constituée par deux bandes voisines surmontant la bande des stérols. Toutefois sur la figure 7, où la résolution est grande, on observe une troisième bande mineure précédant les stérols.

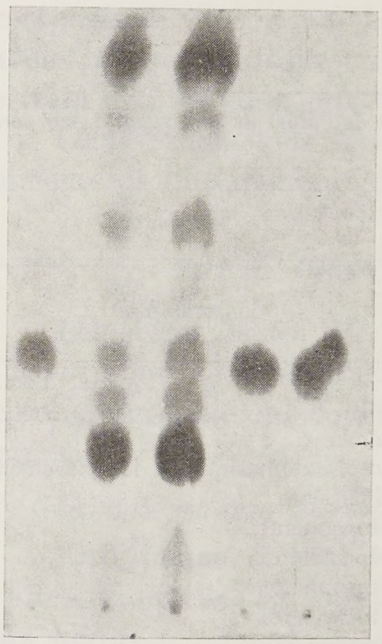


FIG. 24. — *Emplacements comparés du lanostérol* (à gauche et à droite) *et des composés de l'insaponifiable de l'huile de soja* (au centre)
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)

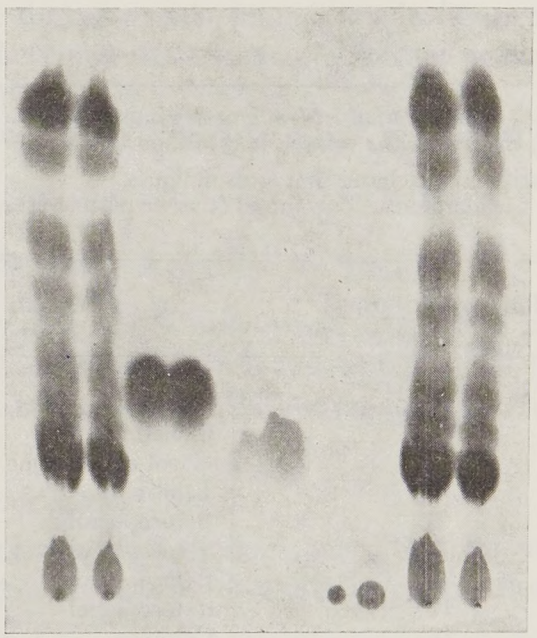


FIG. 25. — *Emplacements comparés de divers alcools et des composés de l'insaponifiable de l'huile de soja*
De gauche à droite : insaponifiable de l'huile de soja (*bis*), linalool (*bis*), 10-undecène-1-ol (*bis*), 2 butène 1-4 diol (*bis*) insaponifiable de l'huile de soja (*bis*).
Solvant de développement : benzène, méthanol (100/1,8)

L'utilisation de divers alcools témoins nous a permis de préciser la nature probable des constituants des bandes observées. Le lanostérol (alcool terpénique) se place au niveau de la bande supérieure (fig. 24), le linalool (ou coriandrol, 3,7-diméthyl-1,6-octadièn-3-ol) se place à un niveau très légèrement inférieur (fig. 25) ; par

contre, l'alcool arachidique se place nettement au niveau de la bande inférieure de la zone pré-stérols (fig. 8 ou 9). Enfin l'undécèn-1-ol possède un Rf plus faible et se place à la hauteur des stérols. Le 2, butèn-1,4-diol, reste à l'origine (fig. 25).

Ainsi la tendance serait, dans l'ordre des Rf décroissants : alcools terpéniques, alcools ramifiés, alcools aliphatiques comme de nombreux auteurs l'ont d'ailleurs

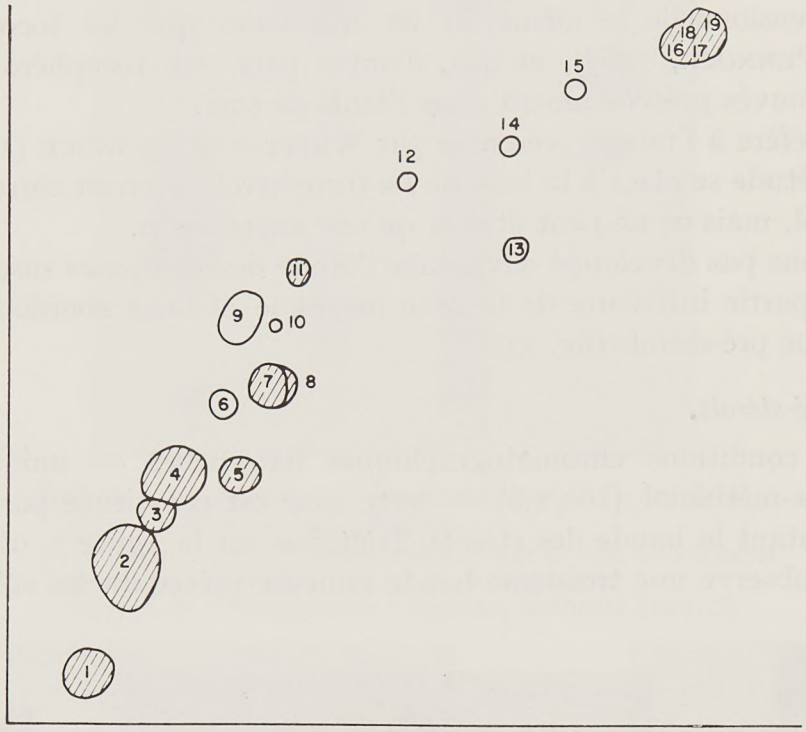


FIG. 26. — *Représentation schématique des constituants de l'insaponifiable de l'huile de soja séparés par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle*

Les constituants hachurés sont seuls indiqués
Solvant 1 : chloroforme. Solvant 2 : éther de pétrole-éther isopropylique (80/20)

Numéro des taches	Témoins	Constituants
1	2-butène-1,5 diol	diols
2	Cholestérol	stérols
3	alcool arachidique	alcools aliphatiques à longue chaîne
4	Lanostérol	triperpènes
5	δ-tocophérol	δ-tocophérol
7	γ-tocophérol	γ-tocophérol
8	β-tocophérol	β-tocophérol
11	α-tocophérol	α-tocophérol
16	Carotène	carotène (?)
17	Esters de stérol	esters de stérol
18	Squalène	squalane, squalène
19	Squalane	autres hydrocarbures

indiqué (KARLESKIND, 1967). Cependant l'interférence de certains composés appartenant à des séries différentes reste possible car deux facteurs supplémentaires sont à considérer : le poids moléculaire qui en s'accroissant réduit le Rf de migration et l'insaturation qui joue dans le même sens. Il peut ainsi exister une interférence entre les alcools terpéniques et les alcools aliphatiques courts et entre les alcools

aliphatiques à plus de 26 atomes de carbone et les stérols (NIKKARI et HAAHTI, 1964). Toutefois, compte tenu du fait que l'on observe des bandes nettement délimitées lorsque les conditions chromatographiques sont choisies en vue d'obtenir une bonne résolution au niveau de la zone « pré-stérols » (fig. 7), il devrait être possible de préciser l'importance exacte des interférences et la nature des composés qui interfèrent, en étudiant spécifiquement la composition de chacune des bandes recueillies séparément.

Cette étude pourrait être menée de front avec l'étude globale des alcools conduite selon la technique de séparation proposée récemment par KARLESKIND (1967) et utilisant le pouvoir complexant de l'urée dans le méthanol.

Sur la figure 5, on observe dans l'insaponifiable du beurre deux bandes équivalentes de faible intensité, surmontant le cholestérol. De telles bandes sont également observées dans les insaponifiables de suif et de saindoux. Les insaponifiables de la margarine examinée et de l'huile de soja montrent tous deux des bandes « alcools » très denses et d'intensité pratiquement uniforme.

c) *Zone des stérols.*

Dans les conditions chromatographiques utilisées, les stérols, quelle que soit leur nature, ont tous le même Rf de migration. Leur étude spécifique sera développée dans d'autres conditions chromatographiques.

Les résultats de nos investigations sur le comportement chromatographique des composés de l'insaponifiable de l'huile de soja, sont résumés sur la figure 26 ; nous avons indiqué par comparaison avec des composés témoins, la nature probable d'un certain nombre de composés de l'insaponifiable.

Cette étude nous sera d'une grande utilité lors de l'analyse des constituants mineurs de l'insaponifiable du beurre.

D. — *Étude spécifique de quelques groupes de composés*

Les stérols isolés par chromatographie sur colonne selon EISNER et *al.* (1962) (fig. 13), ont été spécifiquement étudiés. Pour cela, on a fait appel d'une part à la chromatographie sur couche mince et d'autre part à la chromatographie en phase gazeuse.

1. *Chromatographie sur couche mince des stérols.*

En système normal, les stérols forment une unique tache, tant en uni qu'en bidimensionnelle. En « système inversé », par contre, on observe un fractionnement des stérols.

L'étude a porté sur les fractions recueillies après fractionnement sur colonne (fig. 13), c'est-à-dire F_6 obtenue à partir de l'insaponifiable de la margarine et F_5 obtenue à partir de l'insaponifiable de l'huile de soja (soja 1).

On observe (fig. 27) pour la fraction F_5 de l'insaponifiable de l'huile de soja, deux bandes de Rf inférieur au Rf du cholestérol. La bande légèrement plus intense et de Rf le plus faible est constituée par du β-sitostérol. Dans le cas des stérols provenant de la margarine P (fraction F_6) on observe à côté de deux bandes de Rf inférieur au Rf de la bande du cholestérol, une bande dont le Rf est identique à celui du cholestérol. Certains stérols végétaux peuvent occuper cet emplacement dans les conditions

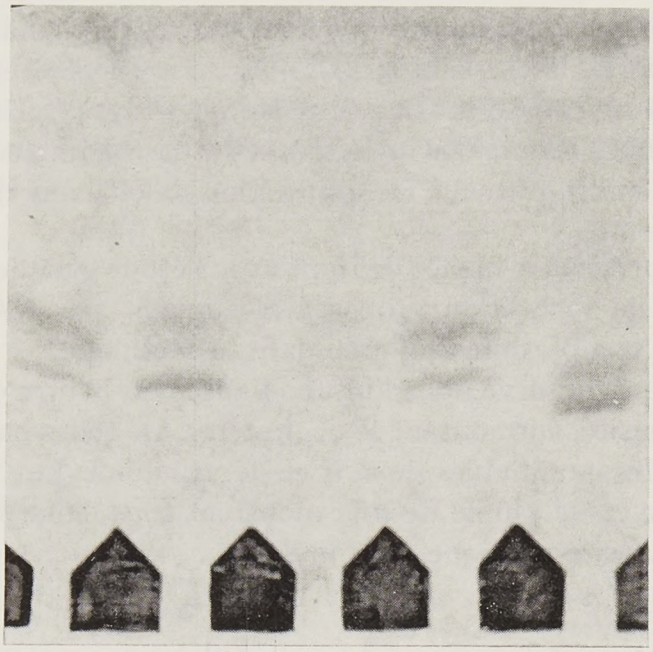


FIG. 27. — *Chromatographie en phase inversée des stérols*
De gauche à droite : cholestérol + β-sitostérol ; fraction F_6 de l'insaponifiable de la margarine; insaponifiable total de la margarine P ; cholestérol + β-sitostérol ; fraction F_6 de l'insaponifiable de l'huile de soja (1)
Solvant de développement : acétonitrile, acide acétique, eau (75/22, 5/2,5).

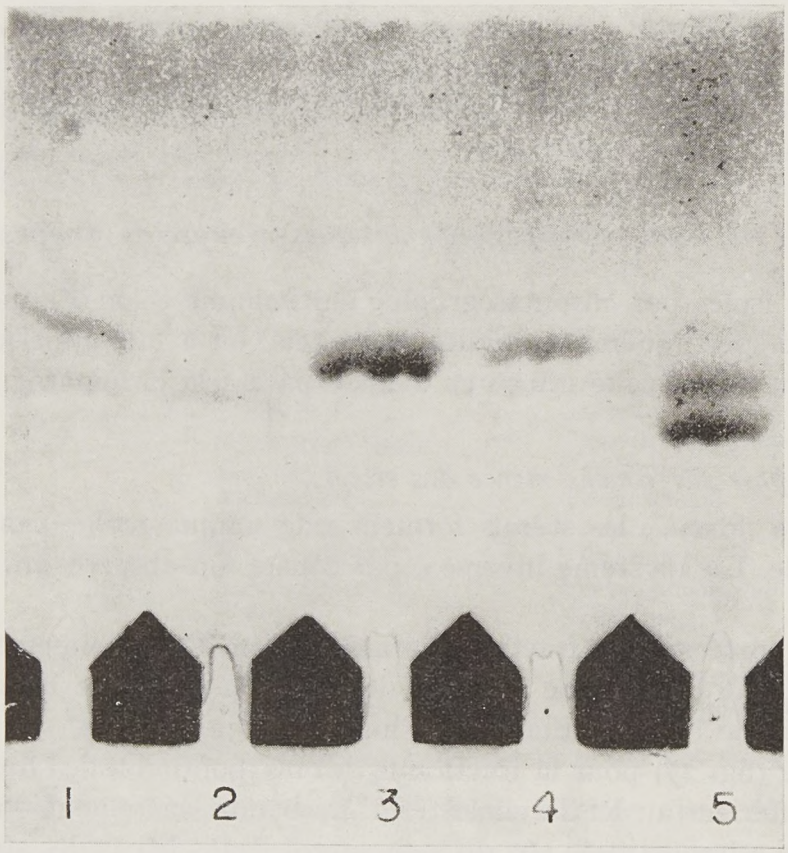


FIG. 28. — *Chromatographie en phase inversée d'insaponifiables divers*
1 : cholestérol + β-sitostérol ; 2 : insaponifiable de la margarine P ;
3 : insaponifiable de beurre ; 4 : insaponifiable de saindoux ;
5 : insaponifiable de l'huile de soja.
Solvant de développement : acétonitrile, acide acétique, eau (75/22 ; 2/2,5)

chromatographiques utilisées, mais la présence d'une huile ou graisse végétale est détectée d'une manière absolue, par l'apparition d'une bande de Rf inférieur au Rf de la bande « cholestérol ».

Nous avons tenté d'utiliser les mêmes conditions chromatographiques que nous venons de rappeler, à l'étude directe des stérols contenus dans l'insaponifiable, sans procéder à leur isolement préliminaire. La figure 28 illustre le résultat obtenu : on observe à partir de l'insaponifiable total de la margarine P d'une part et de l'insaponifiable total de l'huile de soja, d'autre part, pratiquement les mêmes images que celles obtenues respectivement à partir des fractions « stérols », F_6 (margarine) et F_5 (huile de soja) (fig. 27). On dispose ainsi d'une méthode simple et relativement rapide en vue de détecter la présence de graisse végétale dans le beurre par exemple.

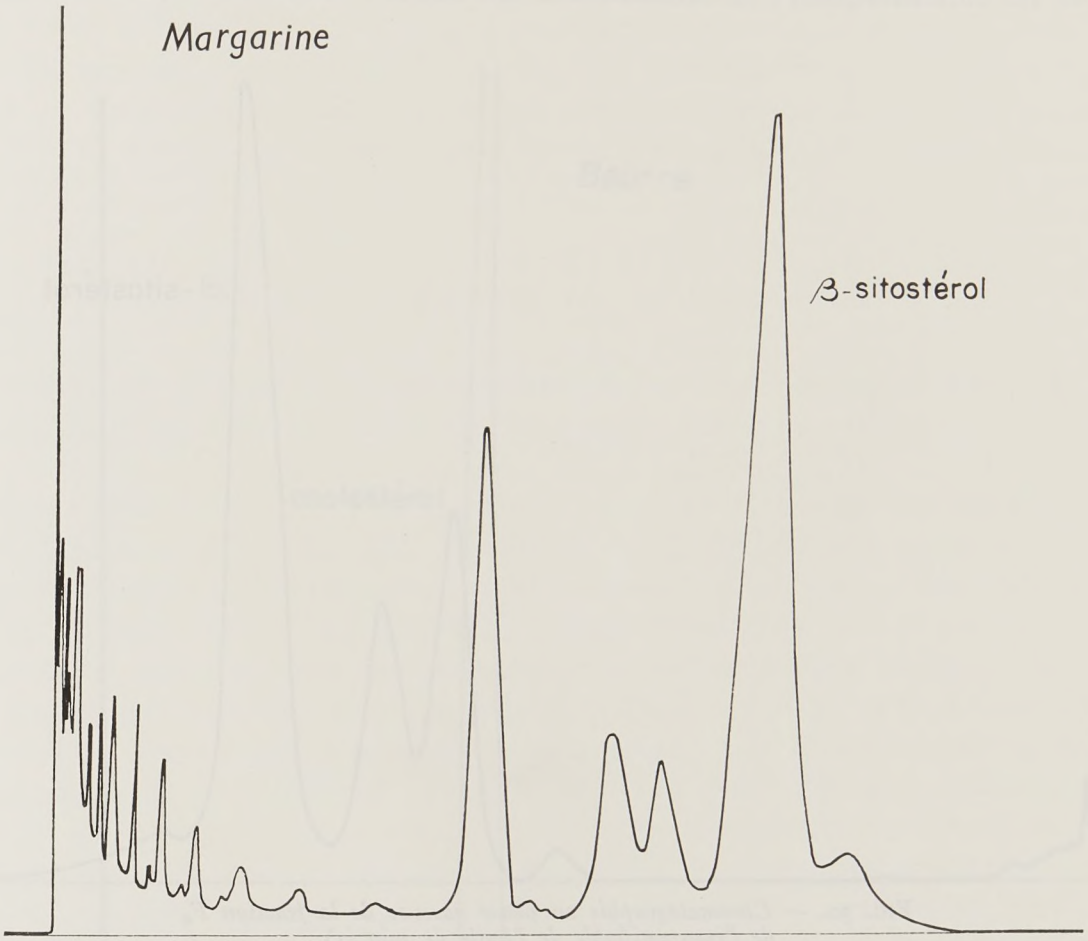


FIG. 29. — *Chromatographie en phase gazeuse de la fraction F_6 de l'insaponifiable de la margarine P*

Toutefois, il est nécessaire de préparer auparavant l'insaponifiable et ceci accroît le temps de l'analyse. Et, si l'on désire seulement étudier la composition des stérols d'une graisse en utilisant la chromatographie sur couche mince, il peut être tout aussi indiqué de recourir à la méthode décrite dans la norme IDF-FIL nº 38 prévue précisément pour permettre la détection d'une graisse végétale dans la graisse laitière par l'emploi de la chromatographie des acétates de stérols, composés moins polaires que les stérols eux-mêmes et par conséquent plus faciles à séparer sur couche mince en phase inversée.

2. *Chromatographie en phase gazeuse des stérols.*

Les différents groupes de stérols recueillis après fractionnement sur colonne des insaponifiables de la margarine P et de l'huile de soja ont également été étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

Sur les figures 29 et 30, on a représenté les chromatogrammes obtenus à partir de l'insaponifiable de la margarine P et de l'insaponifiable de l'huile de soja, et sur la figure 31, le chromatogramme obtenu à partir des acétates de stérols préparés à partir du beurre selon la norme FIL-IDF n° 32. Les stérols de l'huile de soja sont constitués

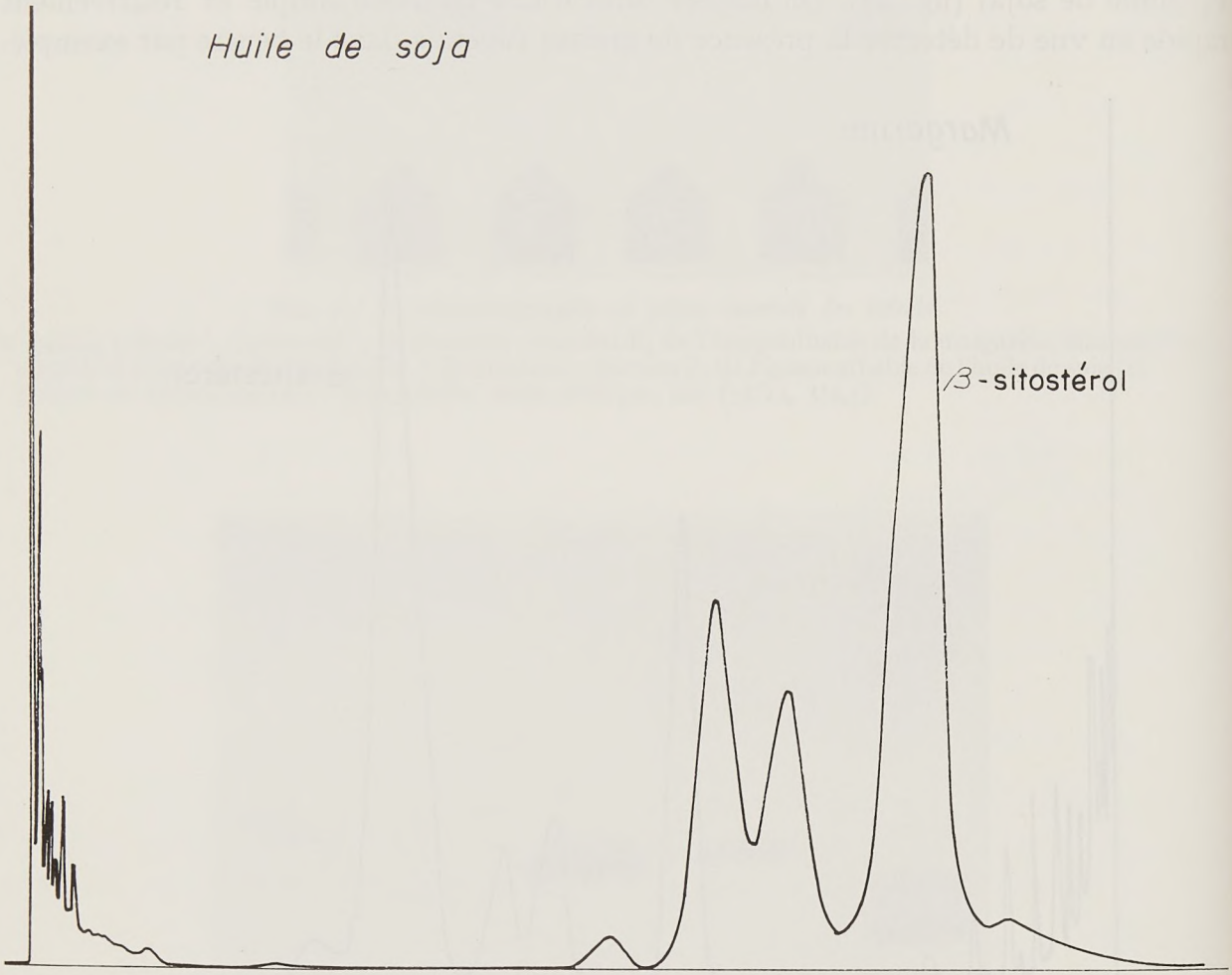


FIG. 30. — *Chromatographie en phase gazeuse de la fraction F_6 de l'insaponifiable de l'huile de soja* (1)

essentiellement par du β-sitostérol, composé au temps de rétention élevé auquel s'ajoutent du stigmastérol et du campestérol dont les temps de rétention sont plus faibles. Les stérols de la margarine examinée, sont également constitués par des phytostérols, mais on observe cependant un pic relativement important dont le temps de rétention est identique à celui du cholestérol.

Le nombre relativement restreint des composés du groupe « stérols » permet d'effectuer une récupération sélective des composés que l'on désire identifier. Sur le chromatogramme correspondant aux stérols de la margarine, on observe en outre la présence de pics mineurs aux temps de rétention faibles, que nous attribuons à des alcools ayant interféré avec les stérols lors du fractionnement sur colonne.

La résolution, dans les conditions chromatographiques indiquées est très bonne et l'analyse des stérols par chromatographie en phase gazeuse, après leur isolement par chromatographie sur colonne ou sur couche mince préparative à partir de l'insaponifiable constitue une excellente méthode de contrôle aux multiples applications (EISNER et *al.*, 1963 ; COPIUS PEEREBOOM, 1965 ; RECOURT et BERTHUIS, 1963 ; KARLESKIND et *al.*, 1966 ; GUILLAUMIN, 1965 ; ROOS, 1967 ; GUYOT, 1967).

La chromatographie sur couche mince nous a ainsi permis de déterminer la nature probable d'un certain nombre de constituants de l'insaponifiable, si l'on admet qu'un comportement chromatographique identique suppose une similitude de nature chimique. Mais par cette technique une identification formelle ne peut être obtenue ; or, c'est précisément ce que nous recherchons afin d'être en mesure d'aborder avec toutes les chances de succès l'étude des constituants de l'insaponifiable du beurre.

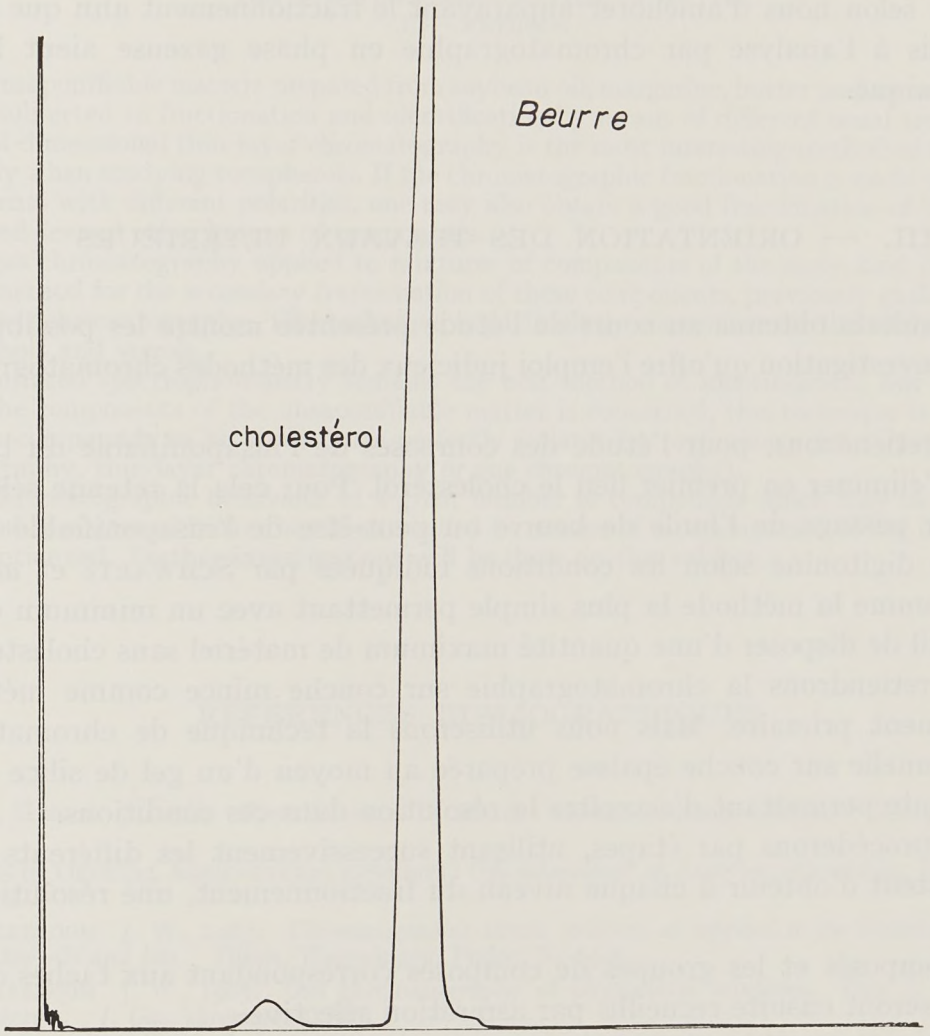


FIG. 31. — *Chromatographie en phase gazeuse « des stérols de beurre » préparés selon la norme IDF-FIL n° 32. Le cholestérol est le seul stérol présent*

Par contre, la chromatographie sur couche mince constitue une étape nécessaire vers l'identification des constituants. En effet, elle s'est révélée être un bon outil de fractionnement en même temps qu'elle permet une récupération aisée des fractions séparées. Or, un bon fractionnement doit nécessairement précéder l'analyse des constituants. Il suffit d'observer les chromatogrammes publiés par EISNER et *al.* (1965 et

1966) après un fractionnement insuffisant pour s'en convaincre. Ces auteurs, en effet, analysent par chromatographie en phase gazeuse, une fraction dans laquelle se trouvent réunis des tocophérols, des alcools aliphatiques, des alcools terpéniques. Les temps de rétention de ces divers composés s'enchevêtrent, rendant pratiquement impossible l'identification de nombreux pics. Dans le cas du beurre, par exemple, les auteurs ne peuvent indiquer si tel pic est dû à l'α-tocophérol ou à l'alcool aliphatique à 28 atomes de carbone, ou tel autre au cycloarténol ou à l'alcool aliphatique à 30 atomes de carbone, etc.

C'est pourquoi nous ne présenterons pas ici les chromatogrammes que nous avons obtenus à partir des différentes fractions recueillies au cours du fractionnement sur colonne des insaponifiables de la margarine examinée et de l'huile de soja.

En effet, à l'exception des stérols toutes les fractions sont des mélanges de nombreux composés. Les chromatogrammes sont alors très difficiles à interpréter. Il convient selon nous d'améliorer auparavant le fractionnement afin que les composés soumis à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse aient la même nature chimique.

III. — ORIENTATION DES TRAVAUX ULTÉRIEURS

Les résultats obtenus au cours de l'étude présentée montre les possibilités très grandes d'investigation qu'offre l'emploi judicieux des méthodes chromatographiques modernes.

Nous retiendrons, pour l'étude des composés de l'insaponifiable du beurre, la nécessité d'éliminer en premier lieu le cholestérol. Pour cela la retenue sélective de celui-ci par passage de l'huile de beurre ou peut-être de l'insaponifiable total sur colonne de digitonine selon les conditions indiquées par Schwartz et *al.* (1967), apparaît comme la méthode la plus simple permettant avec un minimum de temps et de travail de disposer d'une quantité maximum de matériel sans cholestérol.

Nous retiendrons la chromatographie sur couche mince comme méthode de fractionnement primaire. Mais nous utiliserons la technique de chromatographie bidimensionnelle sur couche épaisse préparée au moyen d'un gel de silice de fabrication récente permettant d'accroître la résolution dans ces conditions.

Nous procéderons par étapes, utilisant successivement les différents solvants qui permettent d'obtenir à chaque niveau du fractionnement, une résolution maximum.

Les composés et les groupes de composés correspondant aux taches observées (sous UV) seront ensuite recueillis par aspiration sélective.

La chromatographie en phase gazeuse sera ensuite la méthode universelle pour, l'étude détaillée des groupes de composés pouvant être volatilisés sans crainte de décomposition. Il sera ainsi aisé de démontrer, dans le cas des tocophérols par exemple qu'aucun autre composé n'interfère avec chacun d'eux.

L'identification des composés purs recueillis soit après fractionnement sur couche mince, soit après fractionnement secondaire par chromatographie en phase gazeuse, sera effectuée essentiellement par spectrophotométrie infrarouge.

Enfin, dans le cas des composés non volatils et thermosensibles (cérides non

hydrolysés, éthers du glycérol, cires complexes, etc.) il sera nécessaire de procéder à une hydrolyse ménagée suivie d'une identification des groupes constitutifs.

L'orientation des travaux ultérieurs est ici seulement indiquée. Mais désormais l'étude sera limitée aux seuls constituants de l'insaponifiable du beurre.

Les résultats obtenus seront présentés dans de prochaines publications.

Reçu pour publication en mai 1968.

SUMMARY

THE UNSAPONIFIABLE MATTER OF BUTTER.
I. — METHODS

The unsaponifiable matters prepared from soybean oil, margarine, butter and some other animal fats were subjected to fractionation and identification by means of different usual techniques.

The bi-dimensional thin-layer chromatography is the most interesting method of fractionation, particularly when studying tocopherols. If the chromatographic fractionation is made stage by stage using solvents with different polarities, one may also obtain a good fractionation of hydrocarbons, alcohols and several other groups of components.

The gas chromatography applied to mixtures of components of the same kind constitutes an excellent method for the secondary fractionation of these components, previously gathered together by thin-layer chromatography. This technique is particularly convenient for the study of hydrocarbons, alcohols and sterols.

The infrared spectrophotometry remains the best method of identification, but as far as the study of the components of the unsaponifiable matter is concerned, this technique is only interesting if the compounds to be studied are perfectly isolates by preliminary fractionations (column chromatography, thin-layer chromatography or gas chromatography).

The chromatographic behaviour of a great number of compounds which may be found in the unsaponifiable matter of butter has been studied by means of a combination of the different techniques mentionned. Further investigations will be done on this subject.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André E., Henry J., 1962. Contribution à l'étude des substances insaponifiables. *Rev. fr. Corps gras*, **17**, 559.

Association of Official Agricultural chemists : *Official methods of Analyses*, 9th edition, 1960, Washington, p. 372.

Copius Peereboom J. W., 1963. *Chromatographic sterols analysis as applied to the investigation of milk fat and other oils and fats.* Thesis, Wageningen, Pudoc, Nr-69-8.

Copius Perreboom J. W., 1965. Gas chromatography of phytosterol mixtures. Part I. Identification of phytosterols. *J. Gaz. chromatogr.*, **325**.

Colakoglu M., 1966. Données analytiques nouvelles sur les huiles d'olives. *Rev. fr. Corps Gras*, **13**, 261.

Cunningham N. F., Morton R. A., 1959. Unsaponifiable constituents of liver, ubiquinone and substance SC in various species. *Biochem. J.*, **72**, 92.

Deuel H. J., 1951. *The lipids. Their chemistry and biochemistry.* Interscience publishers. New York.

Eisner J., Wong N. P., Firestone D., Bond J., 1962. Gas chromatography of unsaponifiable matter. I. Butter and margarine sterols. *J. A. O. A. C.*, **45**, 337.

Eisner J., Firestone D., 1963. Gas chromatography of unsaponifiable matter. II. Identification of vegetable oils by their sterols. *J. A. O. A. C.*, **46**, 542.

Eisner J., Iverson J. L., Mozingo A. K., Firestone D., 1965. Gas chromatography of unsaponifiable matter. III. Identification of hydrocarbons, aliphatic alcohols, tocopherols, triterpenoid alcohols and sterols present in olive oils. *J. A. O. A. C.*, **48**, 417.

Eisner J., Everson J. L., Firestone D., 1966. Gas chromatography of unsaponifiable matter. IV, Aliphatic alcohols, tocopherols and triterpenoid alcohols in butter and vegetable oils. *J. A. O. A. C.*, **49**, 580.

Fedeli E., Lanzani A., Capella P., Jacini G., 1966. Triterpen alcohols and sterols of vegetable oils. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **43**, 254.

Govind Rao M. K., Venkob Rao S., Achaya K. T., 1965. Separation and estimation of tocopherols in vegetable oils by thin-layer chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 121.

Guillaumin R., 1965. La détection de la margarine et des matières grasses étrangères dans le beurre. Méthodes modernes. *Rev. fr. Corps Gras*, **12**, 29.

Guyot A., 1967. *La chromatographie en phase gazeuse appliquée à la recherche des falsifications de la matière grasse butyrique.* Colloque d'information scientifique, C. R. A., Gembloux (Belgique) 18 mai, p. 43.

Jack E. L., Smith L. M., 1956. Chemistry of milk fat : a review. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1.

Karleskind A., 1967. Étude des alcools des insaponifiables. I. Application à l'étude des huiles marines. *Rev. fr. Corps Gras*, **14**, 251.

Karleskind A., Audian F., Wolff J. P., 1966. L'analyse des stérols et son application à l'étude de la composition des mélanges de corps gras. *Rev. fr. Corps Gras*, **13**, 165.

Kuzdzal-Savoie S., 1959. Influence de l'alimentation et du climat sur la matière grasse du lait de vache. Aspect qualitatif. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **13**, A 207.

Kuzdzal-Savoie S., Kuzdzal W., 1959. La recherche du lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas du fromage. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 131.

Lemeland P., 1923. Recherches sur le dosage des lipoïdes dans le sang et les tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **5**, 110.

Mervyn L., Morton R. A., 1959. Unsaponifiable fraction of lipid from normal and diseased kidney. *Biochem. J.*, **72**, 106.

Mordret F., 1967. Fractionnement chromatographique de l'insaponifiable de l'huile de colza sur couche mince de silice modifiée. *Rev. fr. Corps Gras*, **14**, 589.

Nikkari T., Haahti E., 1964. The composition of rat skin surface lipids. Analysis of the saponifiable and non saponifiable fractions. *Acta Chem. scand.*, **18**, 671.

Nikolaides N., 1965. Skin lipids. II. Lipid class composition of samples from various species and anatomical sites. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 691.

Paquot C., Mercier J., Mathieu A., Lefort D., Perron R., 1962. Les méthodes analytiques des lipides simples. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **16** (1).

Paquot C., Tassel M., 1966. Sur l'insaponifiable de l'huile d'Avocat. *Oléagineux*, **21**, 453.

Pennck J. F., Hemming F. W., Kerr J. D., 1964. A reassessment of tocopherol chemistry. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **17**, 542.

Recourt J. H., Beerthuis R. K., 1963. Der Nachweis von tierischen Fetten in pflanzlichen olen und Fetten mit Hilfe der gas-chromatographie. *Fette Seifen Anstrich.*, **65**, 619.

Roos J. B., 1963. Detection of foreign fat in milk fat. IDF-FIL. *Annu. Bull.* Part IV.

Roos J. B., 1967. *Le contrôle de la pureté du beurre néerlandais.* Colloque d'information scientifique, C. R. A. Gembloux (Belgique) 18 mai, p. 77.

Schwartz D. P., Burgwald L. H., Brewington C. R., 1966. A simple quantitative procedure for obtaining the insaponifiable matter from butter oil. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **43**, 472.

Schwartz D. P., Drewington C. R., Burgwald L. H., 1967. Rapid quantitative procedure for removing cholesterol from butter fat. *J. Lipid Res.*, **8**, 54.

Shorland F. B., Hansen R. P., 1956. Studies on the composition of New-Zealand butterfat. *19e Congr. internation. Lait*, Rome, **2**, 613.

Stowe H. D., 1963. Separation of β and γ tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 42.

Walbecq M., Wolff J. P., 1965. Journée d'étude sur les constituants des Corps Gras, ITERG. *Rev. fr. Corps Gras*, **12**, 27.

Whittle K. J., Pennock J. F., 1967. The examination of tocopherols by two dimensional thin-layer chromatography and subsequent colorimetric determination. *Analyst*, **92**, 423.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (2), 151-158.

COMPARAISON DES ALCOOLS SUPÉRIEURS DES EAUX-DE-VIE D'ARMAGNAC ET DES WHISKIES

C. JOURET, M. MOUTOUNET

Laboratoire de Technologie,
Station d'Agronomie et d'Œnologie, 31 - Toulouse
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Le dosage quantitatif des alcools supérieurs a été effectué sur des échantillons d'eaux-de-vie d'Armagnac et des whiskies par chromatographie en phase gazeuse.

Outre des différences quantitatives globales, des rapports caractéristiques entre divers alcools supérieurs ont été confirmés entre eaux-de-vie de vin et eaux-de-vie de grain.

INTRODUCTION

Certains types d'eau-de-vie d'Armagnac peuvent s'accommoder d'une addition importante d'eau et constituer ainsi d'excellents « Long Drink ».

C'est ainsi que depuis quelques années, l'Union des Coopératives viticoles de l'Armagnac (U. C. V. A.) présente sur le marché, sous la dénomination de « Big Boss » une eau-de-vie destinée à compléter la gamme des alcools à l'eau.

Il a paru intéressant de comparer analytiquement les eaux-de-vie d'Armagnac classiques, le « Big Boss » et le whisky et d'essayer de relier leurs caractères organoleptiques à la présence en plus ou moins grande quantité de certains composés. L'analyse a porté, dans un premier temps, sur les alcools supérieurs qui globalement représentent la différence quantitative la plus marquée du non-alcool de ces diverses eaux-de-vie. L'*iso*-butanol et les *iso*-pentanols (méthyl-2 et méthyl-3 butanol-1) qui constituent plus de 90 p. 100 de cette fraction, ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse.

Les échantillons analysés comprennent deux Big Boss, un long drink dérivé du Big Boss, diverses eaux-de-vie d'Armagnac d'origine certaine et des whiskies achetés dans le commerce.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Plusieurs techniques de dosage par chromatographie en phase gazeuse des alcools supérieurs ont été utilisées pour les vins et les eaux-de-vie.

FOUASSIN (1959) et BARAUD (1961) dosent dans chaque échantillon l'éthanol par la méthode usuelle et la détermination des autres composés est faite par le rapport des surfaces des pics comparativement à celui de l'éthanol ; un coefficient est établi pour chacun des composés par rapport à l'éthanol.

BOUTHILET et LOWRY (1959) opèrent sur le résidu d'une distillation au bain-marie à 95°C. Ils calculent, de même que YOSHIZAWA et *al.* (1961) la teneur de chaque alcool supérieur en ramenant la surface du pic à une courbe de référence établie à l'aide de solutions pures.

FLANZY et JOURET (1963), WEBB et *al.* (1963), BOIDRON (1966) opèrent sur des extraits et évaluent le pourcentage de chaque surface de pic par rapport à la surface totale des pics du chromatogramme.

MARTIN et *al.* (1963), SINGER et STILES (1965), SINGER (1966), BRUNELLE (1967) dosent les alcools supérieurs dans le whisky et les eaux-de-vie à l'aide d'un étalon interne qui est, soit le *n*-butanol, soit le *n*-pentanol. Ces auteurs possèdent un chromatographe muni d'un détecteur à ionisation de flamme et injectent directement l'échantillon d'eau-de-vie.

Cette dernière technique permettant d'éliminer certaines causes d'erreurs (extraction, variation du débit gazeux durant l'analyse, volume injecté...) paraît la plus satisfaisante pour un dosage quantitatif dans les eaux-de-vie et a donc été retenue.

Le chromatographe utilisé est le modèle Perkin Elmer 2F/F6 avec détecteur à ionisation de flamme.

L'échantillon d'eau-de-vie est directement introduit sur une colonne de 2 mètres de long, 1/4″ de diamètre, en acier inoxydable, remplie de chromosorb P imprégné de 12 p. 100 de carbowax 1500.

Le débit de l'azote vecteur est de 20 ml/mn au détecteur. Les températures de la colonne, de la chambre d'introduction et du détecteur sont respectivement de 100°C, 170°C et 150°C.

Ces conditions opératoires permettent une séparation correcte de l'*iso*-butanol et des *iso*-pentanols et un temps d'analyse court. Le méthyl-2 et le méthyl-3 butanol-1 ont le même temps de rétention sur cette phase et forment un pic commun.

Le *n*-butanol a été choisi comme étalon car : d'une part, en injectant directement les divers échantillons, aucun pic de *n*-butanol n'a été décelé sur les chromatogrammes ; d'autre part, dans les conditions opératoires choisies, le pic du *n*-butanol nettement séparé, se place entre celui de l'*iso*-butanol et celui des *iso*-pentanols et n'accroît donc pas la durée du dosage.

On s'est basé sur la mesure de la surface des pics pour faire le rapport correspondant des produits à doser et de l'étalon interne. Les coefficients d'étalonnage sont de 1 pour l'*iso*-butanol et 0,89 pour l'*iso*-pentanol par rapport au *n*-butanol.

On ajoute à 10 ml d'eau-de-vie, 1 ml d'une solution de *n*-butanol de concentration connue par pesée dans une solution alcoolique de même degré que celui de l'eau-de-vie analysée.

Pour chaque échantillon, deux essais sont réalisés, chacun avec des solutions d'étalon de concentration différente et les injections sont faites 3 fois.

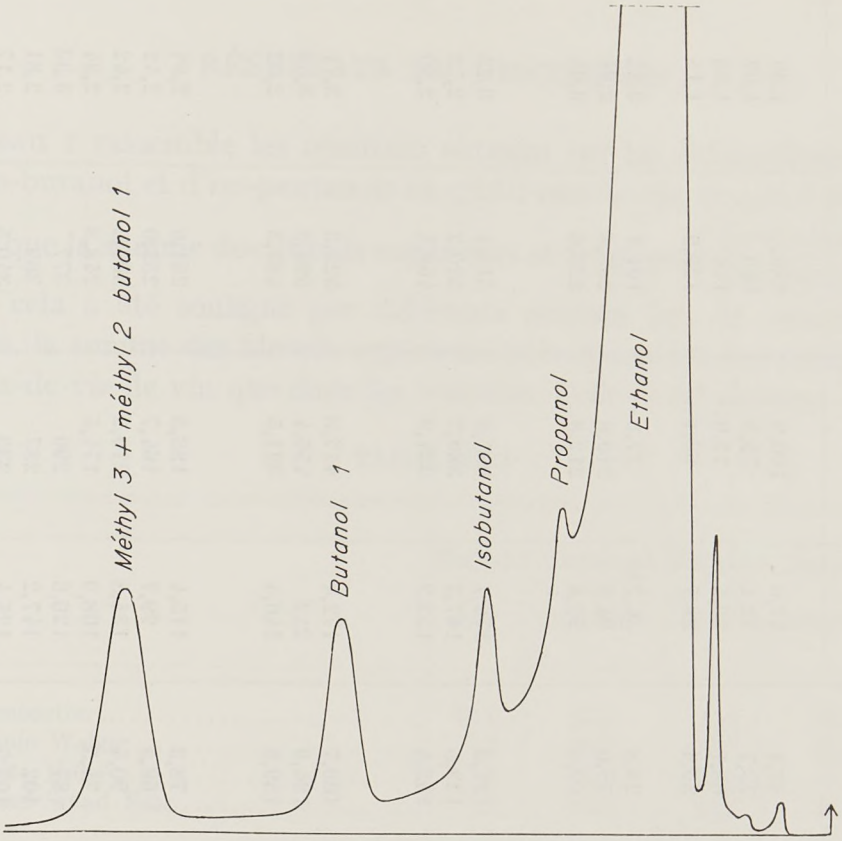
La reproductibilité des résultats est de 3 p. 100.

Les figures 1 et 2 reproduisent des chromatogrammes d'un échantillon d'Armagnac et d'un échantillon de whisky après addition de la solution de *n*-butanol.

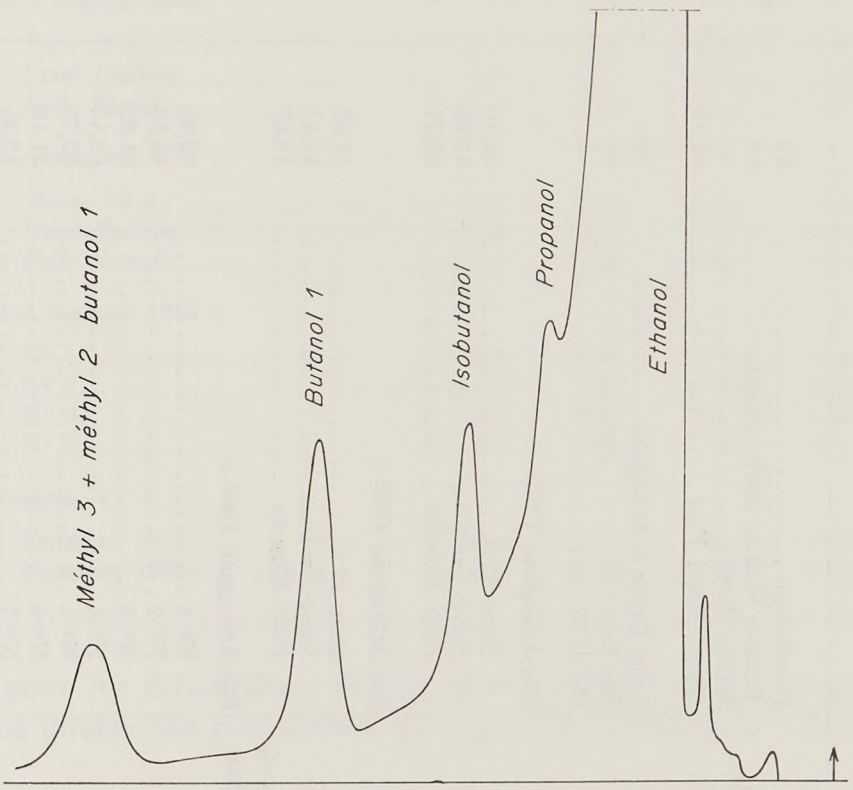
Les deux isomères méthyl-3 et méthyl-2 butanol-1 étant synthétisés à partir des sucres par les levures par deux voies distinctes, il a paru intéressant de déterminer leurs proportions respectives pour avoir un point de comparaison analytique complémentaire. Plusieurs colonnes ont été utilisées par divers auteurs pour séparer ces deux composés :

— VAN DER KLOOT et *al.* (1958) emploient le glycérol comme phase fixe ;
— FOUASSIN (1959) la triéthanolamine ;
— SIHTO et *al.* (1962) une combinaison triéthanolamine et Apiezon ;
— SINGER (1966 *b*) le polyéthylène glycol 200. Dans l'étude de BRUNELLE (1967), on peut noter que le polyglycol E 9000 permet la séparation des 2 isomères.

Dans cette étude sur les armagnacs, une séparation très correcte avec un temps d'analyse court a été obtenue à l'aide d'une colonne d'érythritol, de sorbitol et de diglycérol sur chromosorb P, type de colonne indiquée par BOIDRON (1966). La température du four était de 55°C, et le débit de l'azote vecteur de 60 ml/mn au détecteur ; la proportion des méthyl-3 et méthyl-2 butanol-1 a été identifiée au rapport de la surface des pics respectifs correspondants.



Échantillon d'Armagnac: Big Boss *contenant 63,72 g/hl de* n *butanol*
Chromatographe : Perkin Elmer 2F/F6 ; colonne d'acier inoxydable longueur 2 m, diamètre : 1/4 ″ ; support : chromosorb P ; phase stationnaire carbowax 1500 ; taux d'imprégnation : 12 p. 100 ; température : 100°C ; gaz vecteur : azote 25 ml/mn : quantité d'échantillon : 1 µl.



Échantillon de Whisky: White horse *contenant* 63,72 *g/hl de* n-*butanol*
Chromatographe : Perkin Elmer 2 F/F 6 ; colonne d'acier inoxydable longueur 2 m, diamètre : 1/4 ″ ; support : chromosorb P ; phase stationnaire carbowax 1500 ; taux d'imprégnation : 12 p. 100 ; température : 100°C ; gaz vecteur : azote 20 ml/mn ; quantité d'échantillon : 1 µl.

TABLEAU I

Échantillons		Degré alcool	iso-butanol		iso-pentanols		Total g/hl/100°	Rapport $\frac{IC_5}{IC_4}$
			g/hl	g/hl/100°	g/hl	g/hl/100°		
Whisky	Dumbarton	43	35,3	82,1	47,6	106,9	189	1,30
	Johnnie Walker (carte rouge)	43	31,7	73,7	32,4	75,3	149	1,02
	White Horse	43	29,3	68,1	33,5	77,9	146	1,15
	Grand Stand Fast	42,15	24,9	59,1	28,7	68,1	127,2	1,15
Eaux-de-vie d'Armagnac	Long Drink d'Armagnac	45	10,7	23,8	34,78	77,3	101,1	3,24
	Big Boss (1)	45	34,2	75,0	94,9	210,8	285,8	2,81
	Big Boss (2)	45	31,4	69,8	95,8	212,8	228,6	3,04
	Bas-Armagnac 1945 :							
	Baco 22 A	45,10	54,7	121,3	176,7	391,8	513,1	3,23
	Saint-Émilion	45,05	61,5	139,5	167,7	380,7	520,2	2,73
	Folle Blanche	45,77	61,1	133,5	153,3	334,9	468,4	2,50
	Bas-Armagnac 1952 :							
	Baco 22 A	41,25	45,3	109,7	172,4	417,8	527,5	3,71
	Saint-Émilion	46,45	62,7	134,9	212	456,4	591,3	3,38
	Folle Blanche	43,67	68,1	159,8	140,4	321,5	481,3	2,02
	Bas-Armagnac 1966 :							
	N° 1	62,95	49,3	78,3	115,4	183,3	261,6	2,34
	N° 2	60,55	41,4	68,3	99,7	164,7	233,0	2,41
	N° 3	61,95	56,0	90,4	135,8	219,2	309,6	2,42
	N° 4	62,45	46,5	74,5	108,9	174,4	248,9	2,34
	N° 5	52,75	43,0	87	126,6	290	377	3,33
	N° 6	51,40	52,6	102	147,2	287	389	2,81
	N° 7	63,35	68,8	107,5	125,4	233	340,5	2,17
	Armagnac							
	Tenarèze 1941	46,45	35,3	75,9	115,6	248,8	324,7	3,27
	Tenarèze 1966	55,7	34,1	61,2	131,1	235,9	296,6	3,85

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 rassemble les résultats obtenus sur les échantillons et comporte les taux d'*iso*-butanol et d'*iso*-pentanols en g/hl d'eau-de-vie, en g/hl d'éthanol ramené à 100°, ainsi que la somme des alcools supérieurs et le rapport $\frac{\textit{iso}\text{-pentanol}}{\textit{iso}\text{-butanol}}$.

Comme cela a été souligné par différents auteurs lors de premières analyses comparatives, la somme des alcools supérieurs principaux est beaucoup plus grande dans les eaux-de-vie de vin que dans les whiskies. Celle-ci est environ deux fois plus

TABLEAU 2

		Méthyl-2 Butanol-1		Méthyl-3 Butanol-1		$\frac{\text{Méthyl-2}}{\text{Méthyl-3}}$ C_4
		g/hl	g/hl/100°	g/hl	g/hl/100°	
Whiskies	Dumbarton	12,4	27,7	35,2	79,2	0,35
	Johnie Walker	8,9	20,7	23,5	54,6	0,38
	White Horse	9,0	21,0	24,5	56,9	0,37
	Grand Stand Fast	7,4	17,7	21,3	50,4	0,35
Eaux-de-vie d'Armagnac	Long Drink d'Armagnac	6,5	14,9	28,3	62,4	0,23
	Big Boss n° 1	17,1	38,0	77,8	172,8	0,22
	Big Boss n° 2	17,3	38,4	78,5	174,4	0,22
	Bas-Armagnac 1945:					
	Baco 22 A	31,9	70,7	144,8	321,1	0,22
	Saint-Émilion	29,1	66,1	138,6	314,6	0,21
	Folle Blanche	27,8	62,6	124,6	272,3	0,23
	Bas-Armagnac 1954 :					
	Baaco 22 A	28,7	69,6	143,7	348,2	0,20
	Saint-Émilion	39,6	85,3	172,4	371,1	0,23
	Folle Blanche	25,3	58,0	115,1	263,5	0,22
	Bas-Armagnac 1966 :					
	N° 1	20,8	33,1	94,6	150,2	0,22
	N° 2	18,0	29,7	81,8	135,0	0,22
	N° 3	24,5	39,5	111,3	179,7	0,22
	N° 4	19,6	31,4	89,3	143,0	0,22
	Armagnac :					
	Tenarèze 1941	19,3	41,5	96,3	207,3	0,20
	Tenarèze 1966	23,6	42,5	107,5	193,4	0,22

importante pour les échantillons de Big Boss et d'eaux-de-vie jeunes et devient trois et même quatre fois plus grande pour certains échantillons d'eaux-de-vie classiques.

Le taux d'*iso*-butanol des eaux-de-vie de vin jeunes, de l'ordre de grandeur de celui des whiskies, augmente en général d'une façon importante avec le vieillissement ; exception faite pour l'échantillon Ténarèze 1941.

Les taux d'*iso*-pentanols par contre, restent toujours très nettement supérieurs à ceux des whiskies ce qui fait que le rapport $\frac{\textit{iso}\text{-pentanols}}{\textit{iso}\text{-butanol}}$ légèrement supérieur à l'unité pour les whiskies atteint en moyenne un chiffre trois fois plus élevé pour le Big Boss.

Pour certains consommateurs, il serait intéressant de créer un long drink d'Armagnac ayant un caractère moins marqué d'eau-de-vie de vin ; ce but explique l'essai de long drink nouveau de l'U. C. V. A. Mais si, dans ce cas, la somme des alcools supérieurs est réduite et voisine de celle des whiskies, le rapport $\frac{\textit{iso}\text{-pentanols}}{\textit{iso}\text{-butanol}}$ reste celui d'un armagnac, c'est-à-dire voisin de 3.

Dans le tableau 2 sont rassemblés les résultats des dosages du méthyl-3 et du méthyl-2 butanol-1 trouvés dans chacun des échantillons ainsi que leur rapport.

D'une façon générale dans tous les échantillons analysés le taux du méthyl-2 butanol-1 est nettement inférieur au méthyl-3 butanol-1.

On peut noter d'autre part que la différence globale quantitative des *iso*-pentanols entre whiskies et eaux-de-vie de vin est due surtout au méthyl-3 butanol-1 (de 100 à 300 g/hl/100°).

Le rapport $\frac{\text{méthyl-2}}{\text{méthyl-3}}$ butanol-1 est plus faible dans le cas des eaux-de-vie d'Armagnac : 0,20 à 0,23 pour 0,35 à 0,38 pour les whiskies.

Singer (1966 *b*) avait déjà noté dans son travail que la valeur de ce rapport pourrait servir à différencier les alcools de grain et ceux de vin. Les valeurs du rapport trouvées par cet auteur dans les whiskies et les cognacs sont semblables à celles rapportées ici.

CONCLUSION

La différence des alcools supérieurs des whiskies et des eaux-de-vie de vin repose non seulement sur un taux global quantitatif mais également sur une proportion différente des composés dosés.

Le « long drink » d'Armagnac, moins riche en alcools supérieurs que les eaux-de-vie classiques, se rapproche des whiskies mais conserve cependant les caractéristiques des eaux-de-vie de vin.

Reçu pour publication en avril 1968.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements à l'Union des Coopératives vinicoles de l'Armagnac à Eauze pour son aimable don d'échantillons d'eaux-de-vie.

SUMMARY

COMPARING THE HIGHER ALCOHOLS OF « ARMAGNAC » AND WHISKY SPIRITS

The author compares the higher-alcohol contents (isobutanol, methyl-3 and methyl-2 butanol-1) of whiskies, Armagnac spirits to be taken either dry or with water

The higher alcohols were determined quantitatively by injecting the sample direct by means of gas chromatography, using a flame-ionization detector. The phases used were « Carbowax 1500 », erythritol, sorbitol and diglycerol on chromosorb P.

Grain spirits have a total content of higher alcohols which is less than that of brandies. The ratios : isopentanols to isobutanol, and methyl-2 butanol-1 to methyl-3 butanol-1 are typical of the spirits analysed. Although the Armagnac spirits to be taken with water have a lesser higher-alcohol content than those to be taken neat, they have the same ratios as the latter.

RESUMEN

COMPARACIÓN DE LOS ALCOHOLES SUPERIORES DE LOS AGUARDIENTES DE ARMAGNAC Y DE LOS WHISKYS

Los autores comparan las relaciones de los alcoholes superiores (isobutanol, metil-3 y metil-2 butanol-1) de los whiskys, de los aguardientes de Armagnac clásicos y de los aguardientes de Armagnac destinados a ser consumidos mezclados con agua.

Los alcoholes superiores han sido dosificados cuantitativamente por inyección directa de la muestra, por medio de un cromatógrafo en fase gaseosa con detector de la ionización de llama. Las fases utilizadas son el carbowax 1500 y el eritritol, sorbitol y diglicerol, sobre cromosorbo P.

Los aguardientes de grano son menos ricos en alcoholes superiores totales que los aguardientes de vino. Las relaciones $\frac{\text{isopentanoles}}{\text{isolutanol}}$, y $\frac{\text{metil-2 butanol-1}}{\text{metil-3 butanol-1}}$ son caracteristicos de los tipos de aguardientes analizados. Los Armagnacs al agua, aun siendo menos ricos en alcoholes superiores totales que el tipo tradicional, conservan las mismas relaciones que este último.

RASSIUNTO

PARAGONE DELL'ACQUA-VITE DI ARMAGNAC E DEI WHISKI

Gli autori paragonano il tasso di alcoli superiori (isbutanolo, metile-3 e metile-2, butanolo-1) di whiski, d'acquaviti d'Armagnac tradizionali e d'acquaviti d'Armagnac destinate a essere addizionate d'acqua.

Gli alcoli superiori sono stati dosati quantitativamente con iniezione diretta del campione con l'aiuto d'un cromografo in fase gassosa a detettore a ionizzazione di fiamma. Le fasi utilizzate sono il carbowax 1 500 e l'eritritolo sorbitolo e diglicerolo su cromosorbo P.

Le acqueviti di grano sono meno ricche in alcoli superiori totali delle acqueviti di vino. I rapporti $\frac{\text{isopentanolo}}{\text{isobutanol}}$, e $\frac{\text{metile-2 butanol-1}}{\text{metile-3 butanol-1}}$ sono caratteristici dei tipi d'acqueviti analizzati. Gli Armagnac all-acqua benche meno ricchi, in alcoli superiori totali, del tipo tradizionale, conservano gli stessi rapporti di questo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARAUD J., 1961. Étude quantitative par chromatographie en phase vapeur des alcools et esters de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. chim. Fr.*, **10**, 1874-1877.

BOIDRON J. N., 1966. *Essai d'identification des constituants de l'arôme des vins de* Vitis vinifera L. Thèse 3e cycle Bordeaux.

BOUTHILET R. J., LOWREY W., 1959. The use of the gas chromatograph in the determination of the fusel oil in grape brandy. *J. Ass. off. agric. Chemists*, **42** (3), 634-637.

BRUNELLE R. L., 1967. Evaluation of gas liquid chromatography for the quantitative determination of fusel oil in distilled spirits. *J. Ass. off. agric. Chemists*, **46** (2), 294-297.

FLANZY M., JOURET C., 1963. Contribution à l'étude des eaux-de-vie d'Armagnac par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Technol. agric.*, **12** (1), 39-50.

FOUASSIN A., 1959. L'analyse des spiritueux par chromatographie en phase vapeur. *Rev. Ferm. Ind. alim.* **14** (5), 206-212.

GUYMON J. F., INGRAHAM J. L., CROWELL E. A., 1961. *Am. J. of. Enol*, **12**, 60-66.

LAFON R., LAFON J., COUILLAUD P., 1964. *Le cognac, sa distillation*, Baillère Paris.

MARTIN G. F., GAGGIANO G., SCHLESINGER H., 1963. Fusel oil determination by gas liquide chromatography. *J. Ass. off. agric. Chemists*, **46** (2), 294-297.

ORSER R. E., YANG M. Y., 1966. Gas liquid chromatographic analysis of backberry wine extract fermented by different yeast strain. *Amer. J. of. Enol.*, **17** (2), 106-111.

OUGH C. S., GUYMON J., CROWELL E. A., 1966. Formation of higher alcohols during grape juice fermentations at various temperatures. *J. of. Food Sci.*, **31** (4), 620-625.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **2** (2), 85-105.

SIHTO E., NYKANEN L., SUOMALAINEN H., 1962. *Ier symposium international « Les méthodes d'analyse des aliments »*, Bordeaux 8, 12, oct. 1962.

SINGER D. D., STILES J. W. 1965. The determination of higher alcohols in potable spirits : comparaison of colorimetric and gas chromatographic methods. *Analyst*, **90**, 290-296.

SINGER D. D., 1966 *a*. The analysis and composition of potable spirits : determination of C_3, C_4 and C_5 alcohols in whisky and brandy by direct gas chromatography. *Analyst*, **91**, 1079, 127-134.

SINGER D. D., 1966 *b*. The proportion of 2-methyl butanol and 3-methyl butanol in some brandies and whiskies as determined by direct gas chromatography. *Analyst*, **91**, 790-794.

VAN der KLOOT A. P., TENNEY R. I., BAVISOTTO V., 1958. An approach to flavor definition with gas chromatography. *Proc. Amer. Soc. Brew. chem.*, 96-103.

VILLORTH F., SCHMID W., 1956. Über höhere Alkohole im wein. Wein-Wissenchaft, 7.

WEBB A. D., KEPNER R. E., 1961. Fusel oil analysis by means of liquid partition chromatography. *Amer. J. of. Enol.*, **12**, 51-59.

WEBB A. D., RIBÉREAU-GAYON P., BOIDRON J. N., 1963. Premières observations sur l'étude des substances odorantes des vins. *C. R. Acad. Agric.*, **49**, 115-123.

YOSHIZAWAK, FURUKAWAT, TADENUMA M., YAMADA M., 1961. The formation of higher alcohols in the fermentation of amino acids by yeasts. *Agric. biol. Chem.*, **25**, 326-332.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (2), 159-165.

NOTE

ESSAIS DE DÉTERMINATION DU DEGRÉ DE CUISSON DES JAMBONS GRACE A L'ÉPREUVE DE LA PHOSPHATASE

L. KÖRMENDY, B. JACQUET, G. MOCQUOT

Institut hongrois de Recherches sur la Viande, Budapest (Hongrie)

Laboratoire de Charcuterie expérimentale,
Centre technique de la Salaison, 78 - Jouy-en-Josas

Station centrale de Recherches laitières
et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches Zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

Dans une publication récente, nous avons proposé une méthode pour la détermination de l'activité résiduelle de la phénylphosphatase acide (en abrégé « phosphatase ») dans la viande (GANTNER et KÖRMENDY, 1968). Les expériences décrites ci-dessous ont pour but d'adapter cette méthode à la détermination du degré de cuisson des jambons en moule.

LIND a trouvé une liaison étroite entre le degré de cuisson et l'activité de la phosphatase des jambons en boîte. Cependant, SUVAKOV et coll. (1967) ne sont pas arrivés aux mêmes conclusions : d'après eux, il n'existerait entre les deux facteurs qu'une faible corrélation dans le cas des jambons cuits à des températures à cœur supérieures à 65°C.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Fabrication et conditionnement des jambons cuits

Les jambons provenant de porcs *Large White* d'un poids vif de 100 à 110 kg étaient achetés dans un abattoir industriel ; ils étaient conservés 24 h (entre 1° et 3°C) avant pompage.

Les jambons étaient fabriqués sans addition de phosphate, selon le protocole décrit ci-après. Pompage à la veine à raison de 15 p. 100 de saumure par rapport au poids de viande mise en œuvre (composition des saumures de pompage et de cuve pour 100 l d'eau : 13 kg de sel nitrité, 130 g de

nitrate de potassium, 2 kg de saccharose). Durée du saumurage : 48 h. Égouttage réduit à 6 h. Désossage, parage et emballage du jambon sous feuille de polyéthylène avant mise en moule. Dimensions du moule de forme parallélépipédique : 20 × 15,5 × 16 cm. Cuisson à l'eau. Température de l'eau maintenue constante à 68 ou 75°C suivant les expériences pendant toute la durée de l'opération et en tous les points du bac. Contrôle en continu de la température de l'eau et à cœur des jambons avec un enregistreur électronique (Speedomax MECI série 60 000, équipé de sondes hypodermiques type CP 25 A).

Refroidissement des jambons dans leur moule sous courant d'eau froide pendant 2 heures, puis en chambre froide. Après 24 h, démoulage, enlèvement de la gelée, conditionnement sous sac plastique et sous vide. Thermisation de la surface des jambons sous sac plastique dans l'eau bouillante pendant quelques minutes. Stockage entre 1 et 3°C.

Prélèvements effectués sur les jambons

Enlèvement d'une tranche de 4 cm d'épaisseur au milieu du jambon ; puis, à l'aide d'une sonde cylindrique de 2 cm de diamètre, prélèvement de l'échantillon pour analyse au centre géométrique de la tranche. Les prélèvements étaient effectués, en général, 48 à 72 heures après cuisson (à l'exception des analyses portant sur les jambons en cours de stockage).

La détermination de la phosphatase était effectuée suivant la méthode « standard » publiée dans un précédent article.

Constantes de l'analyse : pH = 6,5 ; concentration du substrat : S_0 = 0,01 M ; incubation 1 h à 37°C. Dans certaines expériences (voir fig. 4), nous avons procédé à des essais comparatifs entre la méthode mentionnée ci-dessus et une autre méthode d'analyse effectuée à pH 5,4 et S_0 = 0,03 M (toutes les autres conditions demeurant identiques).

Dispositifs expérimentaux

Dans les expériences résumées sur les figures 1 et 2, nous avons utilisé la méthode des blocs « complètement randomisés ». La méthode des blocs « randomisés », avec répétitions, a, par ailleurs, été employée pour les expériences rapportées sur la figure 3 et dans le tableau 1.

TABLEAU I

Analyse de la variance — Activité de la phosphatase en fonction du stockage des jambons après cuisson en chambre froide (+ 1 à + 3°C) (4 répétitions)

(Température ambiante 75°C ; Température à cœur 65°C)

Origine de la variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F
Totale	6 803,30	48		
Entre groupes	3 461,35	19		
Résiduelle	3 341,95	29	*53,35*	← Base de comparaison Divisée avec la moyenne harmonique
Entre-temps	642,03	4	160,51	3,00+
Entre répétitions	216 61	3	72,20	1,35
Interaction (temps × répétitions)...	655,54	12	54,63	1,02

Temps	1er jour	2e jour	7e jour	14e jour	31e jour
Activité..	19,86^{abc}	27,71	36,38^{a}	33,07^{b}	31,64^{c}

* Significatif

a, b et c : activités ayant entre elles des différences significatives.

Lors de nos investigations sur les changements de l'activité enzymatique au cours du stockage (tabl. 1), les jambons ont été prélevés par groupes de 2 ou de 4 successivement au 1er, 2e, 7e, 14e et 31e jours, expérimentations répétées 4 fois.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les figures 1 et 2 montrent la variation de l'activité de la phosphatase en fonction du temps de cuisson et de la température à cœur des jambons (température de l'am-

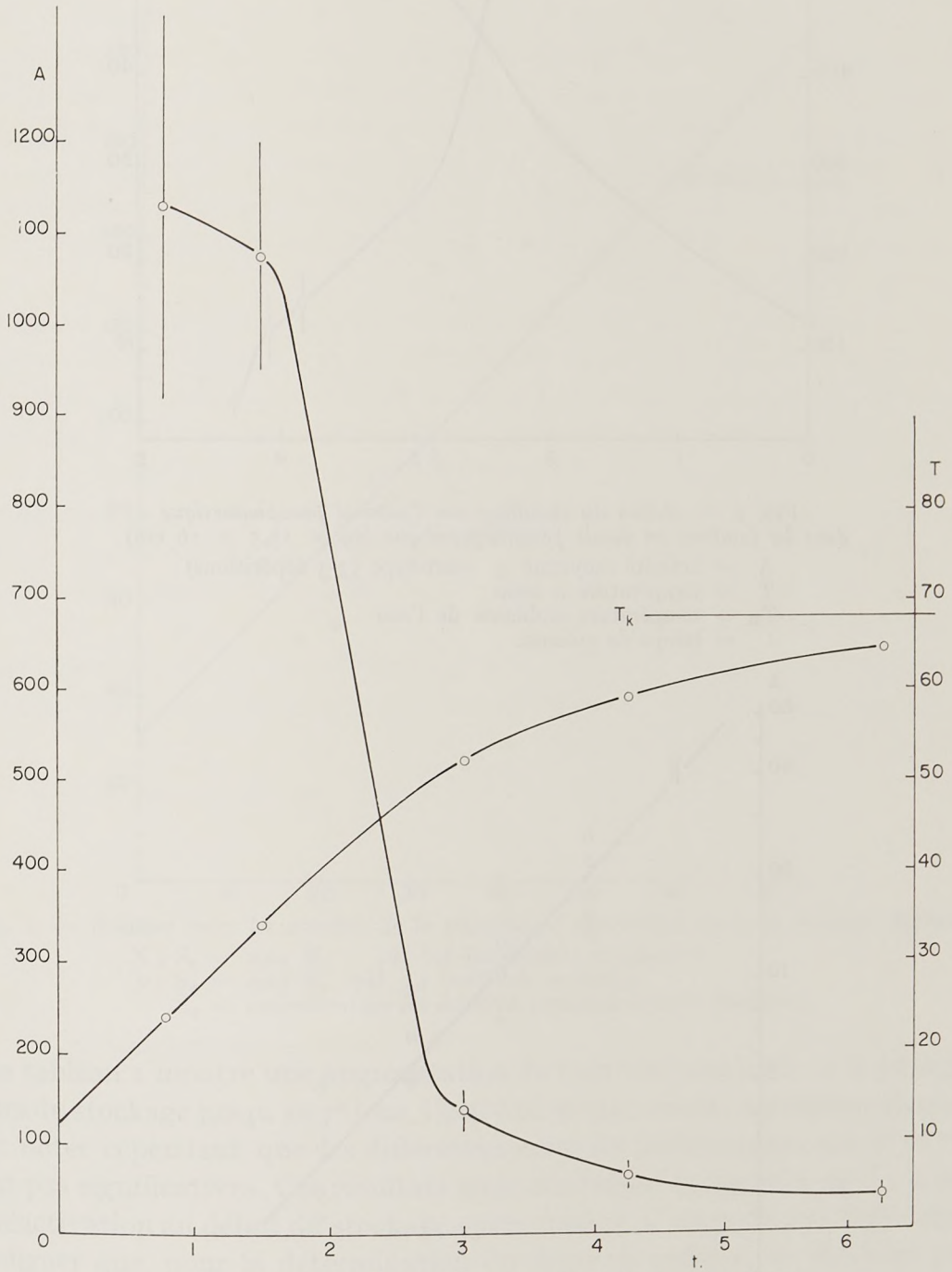


FIG. 1. — *Action du chauffage sur l'activité phosphatasique dans les jambons en moule parallélépipédique* (29 × 15,5 × 16 cm)

A = activité moyenne ± écart-type (3-3 répétitions)
T = température à cœur
T_K = température ambiante de l'eau
t = temps de cuisson.

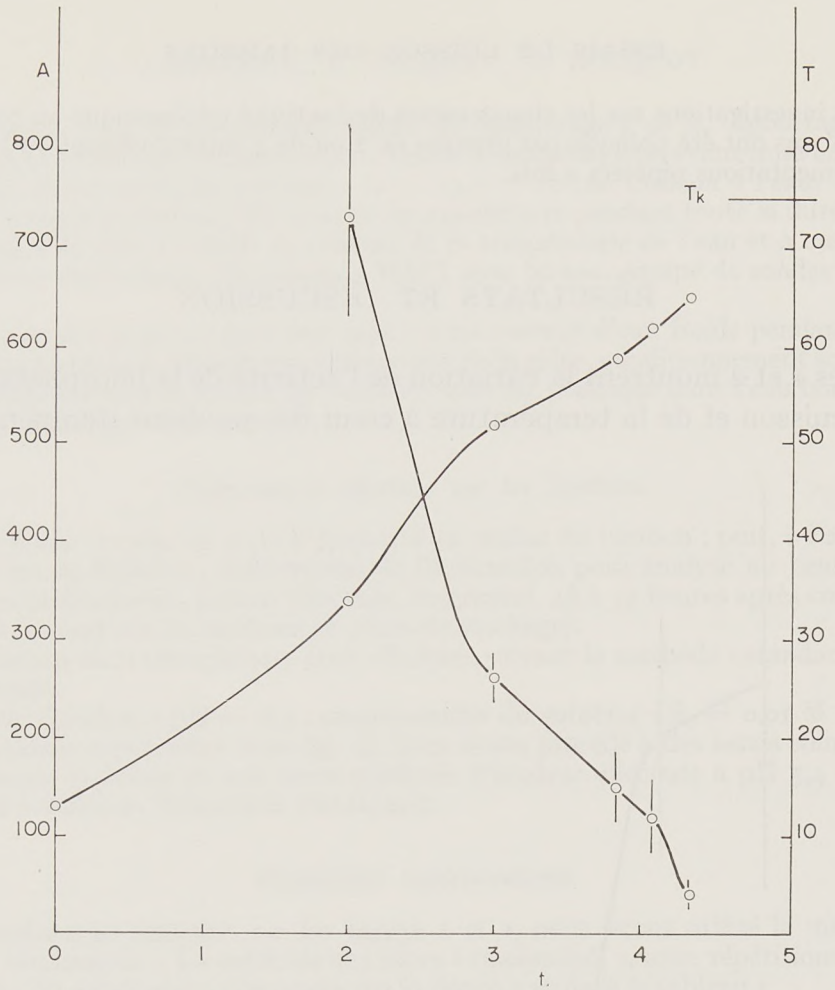


FIG. 2. — *Action du chauffage sur l'activité phosphatarsique dans les jambons en moule parallélépipédique* (29 × 15,5 × 16 cm)

A = activité moyenne ± écart-type (3-3 répétitions)
T = température à cœur
T_K = température ambiante de l'eau
t = temps de cuisson.

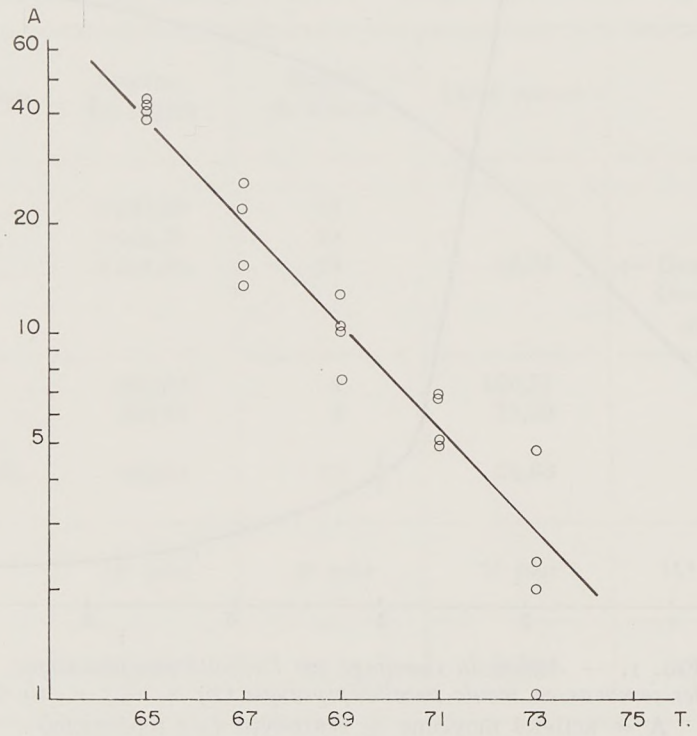


FIG. 3. — *Relation entre la température a cœur atteinte* (T) *dans les jambons en moule* (29 × 15,5 × 16 cm *et l'activité résiduelle de la phosphatase* (exprimée selon une échelle logarithmique) *au-dessus de* 65°C.

Température ambiante de l'eau : 75°C
log A = 10,78 — 0,141 T. Écart-type = 0,63°C. n = 20

biance de cuisson 68° et 75°C respectivement). D'aprés les résultats obtenus, nous avons pu conclure à une décroissance simultanée de l'activité (décroissance monotone) et de l'écart-type pendant la cuisson.

La figure 3 met en évidence la relation entre la température à cœur des jambons et l'activité résiduelle de la phosphatase au-dessus de 65°C ; il est à remarquer que la liaison est étroite, le cofficient de régression est significatif à 0,1 p. 100. Nos résultats concordent avec ceux de LIND.

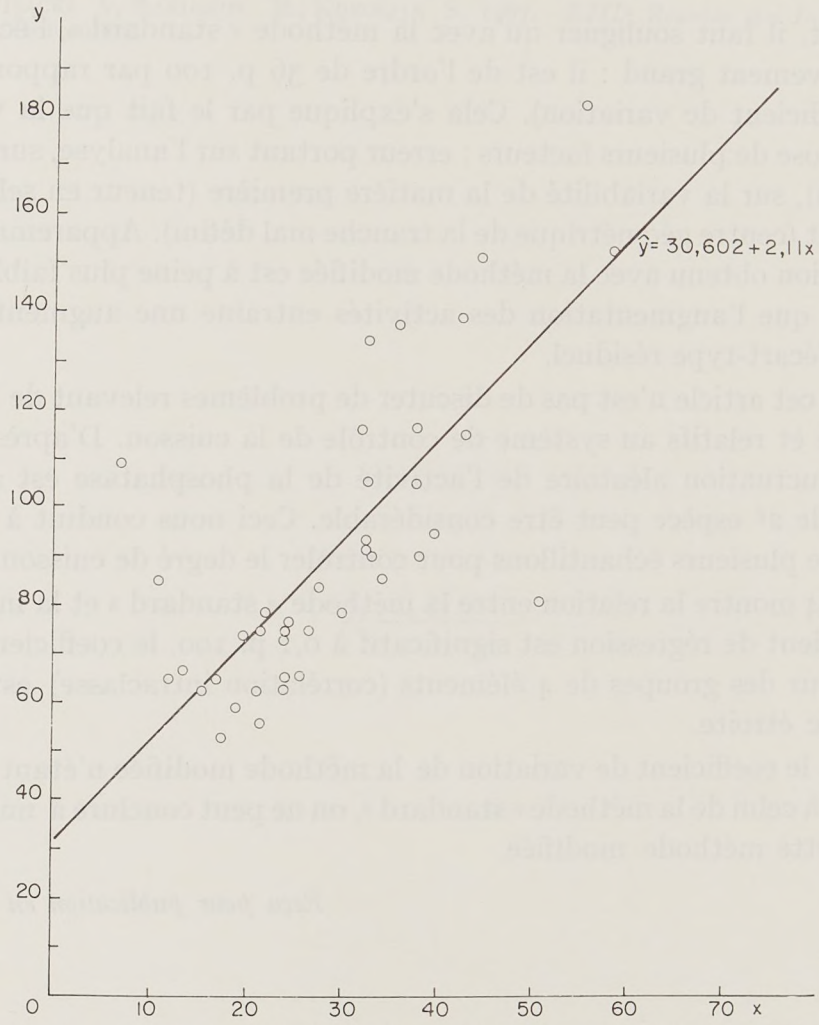


FIG. 4. — *Relation entre les activités de la phosphatase déterminées par deux méthodes différentes*
X ; S_0 = 0,01 M, pH 6,5 (méthode « standard »)
y ; S_0 = 0,03 M, pH 5,4 (méthode modifiée)
S_0 = concentration du substrat phénylphosphate disodique.

Le tableau 1 montre une augmentation de l'activité résiduelle de la phosphatase au cours du stockage jusqu'au 7e jour, l'activité restant ensuite sensiblement constante. Il faut noter cependant que les différences entre les prélèvements aux 2e et 7e jours ne sont pas significatives. Ces résultats nous conduisent à suggérer qu'il y a une certaine réactivation au début du stockage après cuisson. C'est pourquoi, il est important de souligner que, pour la détermination du degré de cuisson, un stockage pendant quelques jours entre + 1 et + 3°C est nécessaire avant tout prélèvement.

Des conclusions semblables ont été émises à la suite de travaux sur la phosphatase du lait (COPIUS-PEEREBOOM, 1966).

Nous avons, par ailleurs, déterminé l'évolution de l'activité de la phosphatase au

cours du stockage avec la méthode modifiée à pH 5,4 et S_0 = 0,03 M (voir matériel et techniques). En opérant sur les mêmes échantillons de viande déjà analysés par la méthode standard, on obtient, avec cette méthode modifiée, des valeurs d'activité plus grandes qu'avec la méthode standard. Avec la méthode modifiée, nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les moyennes ; on a pu observer néanmoins que l'activité tendait à augmenter. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'insuffisance des répétitions au nombre de 3 dans le cas présent (l'erreur de 2e espèce étant plus grande).

Cependant, il faut souligner qu'avec la méthode « standard », l'écart-type résiduel est relativement grand : il est de l'ordre de 36 p. 100 par rapport à l'activité moyenne (coefficient de variation). Cela s'explique par le fait que la variance résiduelle se compose de plusieurs facteurs : erreur portant sur l'analyse, sur l'expérimentation (cuisson), sur la variabilité de la matière première (teneur en sel, pH, etc.) et du prélèvement (centre géométrique de la tranche mal défini). Apparemment le coefficient de variation obtenu avec la méthode modifiée est à peine plus faible (30 p. 100), ce qui signifie que l'augmentation des activités entraîne une augmentation correspondante de l'écart-type résiduel.

Le but de cet article n'est pas de discuter de problèmes relevant de la Statistique Mathématique et relatifs au système de contrôle de la cuisson. D'après les résultats ci-dessus, la fluctuation aléatoire de l'activité de la phosphatase est assez grande, donc l'erreur de 2e espèce peut être considérable. Ceci nous conduit à préconiser le prélèvement de plusieurs échantillons pour contrôler le degré de cuisson.

La figure 4 montre la relation entre la méthode « standard » et la méthode modifiée. Le coefficient de régression est significatif à 0,1 p. 100, le coefficient de corrélation à l'intérieur des groupes de 4 éléments (corrélation intraclasse) est de 0,86 : la liaison est donc étroite.

Toutefois, le coefficient de variation de la méthode modifiée n'étant pas sensiblement inférieur à celui de la méthode « standard », on ne peut conclure à une plus grande efficacité de cette méthode modifiée.

Reçu pour publication en juin 1968.

SUMMARY

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF THE DEGREE OF HAM COOKING BY MEANS OF THE PHOSPHATASE TEST

A monotonous decrease of the phosphatase activity takes place during the cooking of the ham. This decrease is significant even at temperatures above 65°C, taken in the core of the ham. Some reactivation has been observed during the first days of storage in cools rooms. It is therefore necessary, in order to get closer information on the degree of cooking, to keep the ham in cold rooms for several days. The error variance of activity is comparatively large. Consequently, the power of the test can be very low. It is therefore advizable to take several samples to test the degree of cooking.

No noticeable improvement could be obtained by modifying the method and operating at a lower pH and with a more concentrated substrate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CIOPUS PEEREVBOOM J. W., 1966. *Neth. Milk Dairy J.*, **20**, 113.

GANTNER Gy et KORMENDY L. *Fleischwirtschaft.* **48**, 188.

LIND J. *Danske Skinkeundersögelser og Försög*, 25-65 A, Annex F et 25-65 B, Annex G.

SUVAKOV M., VISACKI V, MARINKOV M., KOROLIJA S. 1967. *XIII^e Réunion des Instituts de Recherches sur la Viande*, Rotterdam.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (2), 167-168.

CHRONIQUES DES LIVRES

BIROLAUD (P.), BLACHÈRE (H.), GUILBOT (A.) et MOSSE (P.). PROGRÈS EN CHIMIE AGRICOLE ET ALIMENTAIRE. — Hermann, Paris, 1968, 115 p.

Cet ouvrage traite de sujets intéressant des substances alimentaires d'origine végétale, du point de vue de leur chimie, biochimie et transformations.

Il comprend quatre exposés concernant successivement :

l'amidon, sa structure et sa dégradation enzymatique,
les protéines des céréales,
les fermentations continues,
les levures aliments.

L'amidon est étudié par M. GUILBOT, qui en souligne l'importance primordiale comme aliment glucidique de base. Sont décrites la structure chimique des composants glucidiques de l'amidon : amylase et amylopectine, les modes d'associations qui peuvent exister entre ces composants macromoléculaires, la structure au microscope électronique du grain d'amidon.

La dégradation enzymatique est étudiée *in vitro* et les différents enzymes responsables de la dégradation sont classés en deux groupes, glucosides hydrolases et transglucosylase ou glucotransférase. Le mode d'action de ces enzymes a été étudié sur l'amylase, l'amylopectine et l'amidon à l'état empesé ou granulaire.

P. MOSSÉ traite des protéines des céréales dont l'étude biochimique nécessite leur extraction, purification et fractionnement.

Ces différents problèmes de préparation sont étudiés en soulignant les difficultés du fractionnement ; l'étude des propriétés et de la composition en acides aminés est faite sur les mélanges de protéines constitués par les fractions d'Osborne.

Un paragraphe important est consacré aux aspects agronomiques et nutritionnels de la production des protéines et aux améliorations technologiques envisagées.

Le procédé de fermentation continue est étudié par H. BLACHÈRE sous différents aspects. La cinétique des cultures continues et les appareils réalisés pour l'étude et le maintien de ces fermentations. Le problème biologique de mutations de souche et leurs applications dans les domaines de la recherche et de l'industrie.

Le quatrième exposé est de P. BIROLAUD, sur la levure-aliment considérée comme source de vitamines et de protéines intéressantes pour le bétail, mais également pour compléter la ration alimentaire de l'homme ou pour y suppléer là ou règne l'avitaminose et la déficience en protides alimentaires.

L'auteur conclut en souhaitant que la levure-aliment occupe dans l'alimentation une place plus importante que celle qu'elle occupe actuellement.

REY (L.), éd. — LYOPHILISATION, RECHERCHES ET APPLICATIONS NOUVELLES. — Hermann, Paris, 1966, 214 pages.

Ce livre est le quatrième d'une série consacrée à la lyophilisation publiée sous la direction de Louis REY. Il est dû, comme les précédents, à l'initiative des cours internationaux de Lyophylisation et contient l'essentiel des conférences prononcées à Lyon et Dijon en juillet 1966.

Divers articles sont consacrés à des problèmes théoriques sur les transferts de chaleur et de masse, la structure de la glace.

Une grande place est faite aux sciences biologiques et aux applications dans les industries alimentaires.

Parmi les questions abordées, nous pouvons citer :

— G. Cornaz : La théorie du séchage, comparaison de certains aspects physiques du séchage classique et de la lyophilisation.

— H. de Roissart et T. Laederich : Un développement de l'équation de conduction de chaleur appliqué en lyophilisation.

— Greaves R. I. M. : Importance du stade de précongélation sur la viabilité des organismes lyophilisés.

— Gneiff C. : Recherches sur la congélation, le séchage et la cinétique de la dégradation thermique des virus.

— Goldblith S. A. et Karel M. : Stabilité des aliments lyophilisés.

— Goldblith S. A. : Potentiel d'utilisation de l'énergie ionisante dans la fabrication de la nourriture déshydratée.

Cet ouvrage a été rédigé par des chercheurs de laboratoires, des pharmaciens et des industriels qui souhaitent mettre à profit les dernières recherches et les applications nouvelles. Il doit permettre au lecteur de trouver à la fois des données fondamentales et des réponses pratiques aux problèmes techniques.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire* : il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisament précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons... ; h) *Références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : Dupont et Duval 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatres langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon le World List of Scientific Periodicals, où le Bulletin Signalétique du C.N.R.S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des produits végétaux, 11-Narbonne France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78-Jouy-en Josas. Envoyer deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 11-1968.

Dépôt légal : 4e trimestre 1968. N° d'impression : 2745.

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 17 1968 NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des
auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 175-188.

ÉTUDE DES ACCIDENTS DE FABRICATION DES CONSERVES DE CHAMPIGNONS DE COUCHE *(AGARICUS HORTENSIS)* PROVOQUÉS PAR DES BACTÉRIES THERMOPHILES

I. — Recherche des souches responsables

J. RIVIÈRE, Y. CASSEGRAIN

avec la collaboration technique de Bernadette Berthier

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Microbiologie,
Institut national agronomique, 75 - Paris (5e)
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Ce travail a été réalisé dans le but d'isoler les bactéries responsables des accidents de fabrication des conserves appertisées de champignons de Paris après incubation à 55°. Un certain nombre de souches responsables ont été identifiées. Dans plusieurs cas, l'altération biochimique du contenu de la boîte est due à une association de souches. On a pu classer les différents types d'accidents (pH, aspect du jus, dégagement d'H_2S) en fonction des divers types microbiens isolés.

INTRODUCTION

L'autorisation d'exporter les conserves appertisées de champignons de Paris exige que l'on pratique sur quelques échantillons des différents lots des épreuves d'étuvage à 37° et à 55°. Si les accidents de fabrication dus à des bactéries mésophiles sont rares, les résultats des épreuves d'étuvage à 55° mettent en évidence des accidents fréquents qui peuvent interdire l'expédition des lots incriminés vers les marchés extérieurs. Cependant, il n'existe pas de documentation valable sur le sujet, tant en France qu'à l'étranger, d'où la nécessité d'une enquête sur les lieux de production. Elle s'est limitée à cinq usines réparties dans la vallée de la Loire et le sud-ouest de la France. Cette enquête a mis en évidence que la présence des bactéries

thermophiles dans les conserves de champignons semble très capricieuse, paraissant indépendante des apports de matière première ou des conditions de fabrication.

Des bactéries paraissent être la cause de deux types d'accidents se traduisant par un surissement sans bombage ou par un dégagement d'hydrogène sulfuré, mais leur isolement à partir du contenu des boîtes étuvées ne semble pas avoir été réalisé jusqu'à maintenant d'une façon systématique.

Deux usines sur les cinq ont accepté de nous faire parvenir régulièrement des boîtes-échantillons choisies parmi des lots présumés contaminés, ainsi que du compost aux divers stades de sa fabrication, afin d'étudier ce problème dont l'incidence économique n'est pas à négliger. La première partie de cette étude a consisté à isoler les diverses souches bactériennes responsables, en tenant compte du fait que les échecs antérieurs pouvaient être dus à une autostérilisation à la suite d'une durée d'incubation des boîtes à 55° trop longue, ou bien au choix de milieux de culture incompatibles avec les besoins nutritionnels des germes. On a déterminé ensuite les caractères biochimiques et physiologiques des souches isolées susceptibles d'expliquer les accidents de fabrication, puisque la production d'hydrogène sulfuré ou d'acides organiques d'origine bactérienne doit se faire aux dépens de certains constituants des champignons de couche dont la composition commence à être connue (LATCHE, 1963).

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Dès la réception des échantillons, les boîtes sont mises à incuber dans une étuve à 55°. L'ouverture aseptique des boîtes de chaque lot est faite après deux, cinq et dix jours d'incubation suivant une technique simplifiée (CHEFTEL, 1957).

On prélève alors 10 ml de jus servant à ensemencer trois milieux liquides que l'on considère comme des milieux d'enrichissement. A partir de ces derniers, on réalise des isolements dans des milieux gélosés ou après dilutions décimales dans les mêmes milieux liquides lorsqu'il n'y a pas de croissance microbienne en présence de gélose.

On mesure, en outre, le pH du jus, et l'on fait un examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram.

A. — MILIEUX D'ENRICHISSEMENT ET MILIEUX D'ISOLEMENT

Après de nombreux essais, on a choisi un milieu liquide permettant le développement des bactéries aérobies et anaérobies facultatives, et deux milieux liquides particulièrement adaptés aux bactéries anaérobies strictes.

Ces trois milieux sont ensemencés avec 1 ml du jus prélevé aseptiquement et incubés à 55° jusqu'à l'apparition d'un trouble caractérisant la croissance, pendant une durée maximale de 5 jours.

1. *Bactéries aérobies et anaérobies facultatives*

Le milieu d'enrichissement contient les substances suivantes : extrait de viande (Difco) : 3 g ; bacto-tryptone (Difco) : 2 g ; extrait de levure (Difco) : 2 g ; glucose : 2 g, dans 1 litre d'eau distillée, à pH 7,0.

On le répartit à raison de 10 ml par tube de 18 × 180 mm.

L'isolement et la purification des souches se font à la surface du même milieu gélosé à 15 p. 1 000 (gélose Noble Difco).

2. *Bactéries anaérobies strictes*

On utilise le milieu RCM (HIRSCH et GRINSTED, 1954) et le milieu VL semi-solide utilisé pour la mise en évidence de l'hydrogène sulfuré (BUTTIAUX et *al.*, 1966) légèrement modifiés en ce sens

qu'ils contiennent, par litre, 5 g de bacto-tryptone (Difco) et 5 g de protéose-peptone n° 3 (Difco), et qu'on les recouvre d'huile de vaseline après ensemencement.

L'isolement et la purification se font dans ces mêmes milieux gélosés également (8 p. mille).

B. — Milieux d'identification

Ils ont permis l'étude morphologique, physiologique et biochimique des bactéries isolées. Il y a lieu de distinguer les milieux qui sont utilisés pour les souches aérobies et anaérobies facultatives et ceux qui sont employés dans le cas des souches anaérobies strictes.

Aérobies et anaérobies facultatives

1. *Morphologie.*

a) *Examen microscopique.*

L'examen microscopique du corps bactérien se fait au contraste de phase sur une culture jeune dans du bouillon, à l'état frais, entre lame et lamelle, ou après coloration selon la méthode de Gram.

b) *Forme et position des spores.*

On les détermine sur des frottis colorés au Gram à partir de cultures provenant de divers milieux de sporulation gélosés dont la constitution a nécessité de nombreux essais (Ordal, 1957).

Gélose à la tryptose.

A 1 litre d'eau distillée, on ajoute :

Tryptose (Difco) : 20 g ; glucose : 1 g ; extrait de levure (Difco) : = 3 g.
K_2HPO_4 : 1 g ; NaCl : 5 g.

Gélose à la tryptone.

A 1 litre d'eau distillée, on ajoute :

Bacto-tryptone (Difco) : 20 g ; lab-lemco (Oxoid) : 6 g ;
extrait de levure (Difco) : 6 g ; NaCl : 5 g.

Gélose enrichie en thiamine.

Elle contient, par litre d'eau distillée :

Bacto-tryptone (Difco) : 20 g ; thiamine : 5 mg ; NaCl : 5 g.

Gélose tryptone-glucose.

Elle contient, par litre :

Bacto-tryptone (Difco) : 10 g ; glucose : 5 g.
Ces milieux sont amenés à pH 7,0 et gélosés à 15 g p. litre.

c) *Forme des colonies.*

On a examiné leur forme à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un stéréomicroscope Zeiss.

2. *Physiologie.*

a) *Étude de la mobilité.*

Elle a été mise en évidence par l'examen à l'état frais d'une culture jeune en bouillon, ou après inoculation en piqûre d'un culot de gélose nutritive molle.

b) *Type respiratoire.*

Il est défini après ensemencement dans un tube de 8 × 180 mm contenant une colonne de milieu VL gélosé préalablement régénéré.

c) *Températures de croissance.*

Une goutte d'une culture en bouillon de chaque souche est diluée dans 5 ml d'eau physiologique. Une anse de cette suspension est ensemencée chaque fois à la surface de deux tubes de gélose inclinés et dans deux tubes de bouillon nutritif. Les tubes capuchonnés sont portés 5 jours à 37° et à 55° dans un bain-marie thermostatique et examinés chaque jour. Les souches mésothermophiles ont une croissance nette à 37° et 55° (ALLEN, 1953), tandis que les souches thermophiles strictes ne se développent qu'à 55° seulement (BAUSUM et MATNEY, 1965).

3. *Métabolisme.*

a) *Fermentation du glucose et du fructose.*

On l'étudie à partir d'un milieu de base sans peptones (BUTTIAUX et *al.*, 1966) ou d'un milieu au pourpre de bromocrésol dont la composition est la suivante :

Bacto-tryptone (Difco) : 5 g ; extrait de levure (Difco) : 3 g ; solution à 0,4 p. 100 de pourpre de bromocrésol : 10 ml ; gélose Noble (Difco) : 15 g dans 1 litre d'eau distillée. Le pH est amené à 7,0.

Les solutions de glucose et de fructose stérilisées par filtration sont ajoutées au milieu fondu puis refroidi vers 50° afin d'obtenir une concentration finale de 7,5 p. 1 000.

On incube 10 jours à 55°.

b) *Hydrolyse de l'amidon.*

Elle est mise en évidence après 10 jours d'incubation à 55° (BUTTIAUX et *al.*, 1966).

c) *Production d'acétoïne.*

On recherche l'acétoïne après 10 jours d'incubation à 55° (SMITH et *al.*, 1952).

d) *Hydrolyse de l'urée.*

Elle est détectée après 10 jours d'incubation à 55° (CHRISTENSEN, 1946).

e) *Hydrolyse de la gélatine* (FRAZIER, 1926).

f) *Réduction des nitrates en nitrites* (BUTTIAUX et *al.*, 1966).

g) *Digestion de la caséine* (BUTTIAUX et *al.*, 1966).

Anaérobies strictes

1. *Morphologie.*

a) *Examen microscopique.*

Pour chaque souche, l'examen microscopique à l'état frais de cultures très jeunes, entre lame et lamelle, après avoir soigneusement luté à la paraffine, permet de déceler la mobilité. On effectue également ensuite une coloration de Gram.

b) *Forme et position de la spore.*

La position de la spore a été déterminée sur des frottis colorés au Gram provenant de cultures dans trois milieux liquides incubés à 55° pendant des durées variables (1 à 20 jours) :

Milieu VL viande (BUTTIAUX et *al.*, 1966)
Milieu à l'arginine (PERKINS, 1965)
RCM modifié (milieu d'enrichissement)

c) *Forme des colonies.*

Elle a été examinée dans les deux milieux d'isolement gélosés dans les mêmes conditions d'observation que précédemment.

2. *Physiologie.*

a) *Type respiratoire.*

On a déterminé le type respiratoire de chaque souche par son mode de développement en profondeur dans les deux milieux d'isolement gélosés.

b) *Températures de croissance.*

On ensemence une goutte d'une culture en phase exponentielle dans deux tubes de chacun des deux milieux d'enrichissement, et l'on incube un tube de chaque série dans un bain-marie thermostatique (37° et 55°). On interprète les résultats de la même manière que précédemment.

3. *Métabolisme.*

On a utilisé les techniques de culture des bactéries anaérobies permettant de mettre en évidence un certain nombre de caractères biochimiques des diverses souches (BUTTIAUX et *al.*, 1966) :

a) recherche de l'indole :
b) liquéfaction de la gélatine :
c) production d'hydrogène sulfuré ;
d) action sur le lait cystéiné ;
e) fermentation des glucides.

Dans ce cas, on a modifié légèrement la technique en introduisant dans chaque tube de 14 × 180 mm contenant le milieu VL de base une cloche de Durham renversée afin de mesurer le dégagement gazeux. Avec cette méthode, on a recherché ensuite la fermentation du glucose, du fructose, du saccharose, du lactose, du maltose, de l'amidon, de la glycérine, du mannitol et du sorbitol.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — *Étude des 112 souches bactériennes isolées et purifiées après l'ouverture aseptique des boîtes incubées 2-5 et 10 jours à 55°*

1. *Caractères morphologiques.*

Les souches aérobies et anaérobies facultatives se présentent sous forme de bâtonnets à extrémités arrondies, plus ou moins mobiles, assez trapus, ayant 2 à 4 μ de long sur 1 à 1,5 μ de large, isolés, par paires, parfois en courtes chaînettes, Gram variables, ayant de rares spores ovalaires, déformantes, subterminales. Seule une souche sporule abondamment (*Bacillus circulans 63*).

Les souches anaérobies strictes ont la forme de bâtonnets plus fins de 2 à 6 μ de long sur 0,5 à 1 μ de large, à bouts arrondis, isolés, par paires, ou en courtes chaînettes. La sporulation est très faible, avec des spores ovalaires déformantes subterminales à terminales. On trouve des souches mobiles ou immobiles, Gram positives ou Gram négatives.

2. *Détermination des caractères biochimiques et physiologiques.*

Ils permettent de classer les souches thermophiles dans quatre groupes.

a) *Les bactéries sporulées aérobies strictes.*

Leur fréquence et leur répartition sont résumées dans le tableau 1.

Elles ont comme caractères communs l'hydrolyse de l'amidon, la production d'acide à partir du glucose et du fructose, et la réduction des nitrates en nitrites.

28,6 p. 100 de ces souches sont mésothermophiles, tandis que les autres sont thermophiles strictes. Leur répartition varie beaucoup suivant l'origine des boîtes. Ainsi, il n'y a pas de souches mésothermophiles dans les boîtes provenant de l'usine A. De plus, dans ces dernières, on ne retrouve que 20 p. 100 du nombre total des souches de ce premier groupe qui semblent assez caractéristiques de la pollution des boîtes de l'usine B. Notons qu'en général ces souches fermentent le glucose et le fructose dans un milieu sans peptones où la source d'azote est sous forme de phosphate d'ammonium.

TABLEAU I

Fréquence et répartition des bactéries sporulées thermophiles aérobies strictes dans les conserves de champignons de couche

Action de la température	Caractères biochimiques des souches			Répartition des souches suivant la provenance des boîtes					
				Usine A		Usine B		Total des 2 usines	
	Hydrolyse de la caséine	Liquéfaction de la gélatine	Hydrolyse de l'urée	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%
Mésothermophiles	+	+	—	0	0	2	5,7	2	5,7
		—	—	0	0	4	11,4	4	11,4
	—	+	—	0	0	1	2,9	1	2,9
		—	+	0	0	1	2,9	1	2,9
			—	0	0	2	5,7	2	5,7
Thermophiles strictes	+	+	—	1	2,9	5	14,3	6	17,2
			+	1	2,9	0	0	1	2,9
		—	—	0	0	3	8,6	3	8,6
	—	+	+	1	2,9	2	5,7	3	8,6
			—	1	2,9	3	8,6	4	11,4
		—	+	1	2,9	1	2,9	2	5,7
			—	2	5,7	4	11,4	6	17,1
Nombres et pourcentages totaux des souches isolées				7	20	28	80	35	100

b) *Les bactéries sporulées anaérobies facultatives.*

Le tableau 2 résume leur fréquence et leur répartition. Les caractères communs de ces souches sont les mêmes que ceux du premier groupe.

Il y a 30 p. 100 de souches mésothermophiles réparties à raison de 25 p. 100 dans les boîtes originaires de l'usine B et 5 p. 100 dans celles provenant de l'usine A.

TABLEAU 2

Fréquence et répartition des bactéries sporulées thermophiles anaérobies facultatives dans les conserves de champignons de couche

Action de la température	Caractères biochimiques des souches			Répartition des souches suivant la provenance des boîtes					
				Usine A		Usine B		Total des 2 usines	
	Hydrolyse de la caséine	Liquéfaction de la gélatine	Hydrolyse de l'urée	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%
Mésothermophiles	+	+	+	1	5	2	10	3	15
			—	0	0	1	5	1	5
		—	—	0	0	2	10	2	10
Thermophiles strictes	+	+	—	3	15	2	10	5	25
		—	—	0	0	6	30	6	30
	—	+	—	2	10	1	5	3	15
Nombres et pourcentages totaux des souches isolées.....				6	30	14	70	20	100

TABLEAU 3

Fréquence et répartition des bactéries sporulées thermophiles anaérobies strictes produisant de l'hydrogène sulfuré dans les conserves de champignons de couche

Caractères biochimiques des souches				Répartition des souches suivant la provenance des boîtes					
				Usine A		Usine B		Total des deux usines	
Coagulation du lait cystéiné	Hydrolyse de la gélatine	Fermentation du glucose et du fructose	Dégagement gazeux (glucose et fructose)	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%
+	+	+	—	1	3,5	0	0	1	3,5
	—	+	+	5	17,2	0	0	5	17,2
		—	—	1	3,5	0	0	1	3,5
—	+	+	+	3	10,3	0	0	3	10,3
		—	—	1	3,5	0	0	1	3,5
	—	+	+	5	17,2	0	0	5	17,2
			—	4	13,8	0	0	4	13,8
		—	—	9	31,0	0	0	9	31,0
Nombres et pourcentages totaux des souches isolées.....				29	100	0	0	29	100

L'ensemble des souches de ce 2e groupe paraît également caractéristique des boîtes originaires de l'usine B, puisque 70 p. 100 d'entre elles ont été isolées dans des boîtes provenant de cette dernière usine.

En outre, on peut noter que les souches classées dans ces deux groupes forment un ensemble assez homogène, sauf en ce qui concerne la souche 63 qui sporule abondamment et dont le taux de croissance est beaucoup plus élevé que les autres. Elle a les caractères de *Bacillus circulans*.

On admet que ces souches se rattachent au groupe de *Bacillus stearothermophilus* (Breed et *al.*, 1957).

c) *Les bactéries anaérobies strictes* produisant de l'hydrogène sulfuré (on note leur fréquence et leur répartition dans le tableau 3).

Toutes les souches isolées proviennent des boîtes de l'usine A. Sur les 29 souches, 8 ont les caractères de *Clostridium nigrificans* et une ceux de *Caduceus thermophilus alpha* (Prévot et *al.*, 1967).

d) *Les bactéries anaérobies strictes* ne produisant pas d'hydrogène sulfuré. La lecture du tableau 4 fait ressortir qu'elles sont à peu près également réparties dans les boîtes provenant des deux usines A et B. Certaines d'entre elles voisines de *Plec-*

TABLEAU 4

Fréquence et répartition des bactéries sporulées thermophiles anaérobies strictes non productrices d'hydrogène sulfuré dans les conserves de champignons de couche

Caractères biochimiques des souches				Répartition des souches suivant la provenance des boîtes					
				Usine A		Usine B		Total des deux usines	
Coagulation du lait cystéiné	Hydrolyse de la gélatine	Production d'acide (glucose et fructose)	Dégagement gazeux (glucose et fructose)	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%	Nbre de souches	%
+	+	—	—	0	0	1	3,6	1	3,6
+	—	+	+	3	10,7	0	0	3	10,7
+	—	+	—	3	10,7	1	3,6	4	14,3
+	—	—	—	1	3,6	0	0	1	3,6
—	+	+	—	1	3,6	0	0	1	3,6
—	+	—	—	0	0	1	3,6	1	3,6
—	—	+	+	1	3,6	0	0	1	3,6
—	—	+	—	6	21,4	3	10,7	9	32,1
—	—	—	—	1	3,6	6	21,4	7	25,0
Nombres et pourcentages totaux des souches isolées				16	57	12	43	28	100

tridium thermoaceticum fermentent le glucose et le fructose avec production d'acides organiques sans gaz, ce qui les rend responsables d'un surissement sans bombage ayant les mêmes caractéristiques que celui dû aux bactéries des deux premiers groupes.

D'autres bactéries de ce groupe sont gazogènes aux dépens des oses : trois souches ont les caractéristiques de *Terminosporus thermosaccharolyticus* et deux souches se rattachent à *Caduceus thermoaerogenes*.

Parmi les autres souches de ces deux derniers groupes, certaines d'entre elles n'ont pas pu être caractérisées, car elles se développent mal en dehors des milieux d'enrichissement, d'où l'impossibilité de réaliser une galerie d'identification.

D'autres encore ont pu être obtenues sous forme de colonies séparées produisant (noires) ou ne produisant pas d'hydrogène sulfuré (blanches) dans un milieu gélosé, mais n'ont pas donné lieu à des subcultures permettant leur identification.

B. — *Relation entre les accidents de fabrication et les caractères biochimiques des souches présentes dans les boîtes étuvées*

Dans le tableau 5, on a classé les boîtes altérées en fonction du pH de leur jus, en considérant que le pH moyen d'une boîte intacte était voisin de 6,0 (en fait il y a d'assez grandes variations suivant les fabrications). Il faut noter qu'il n'existe pas seulement deux types d'accidents de fabrication bien définis, tels que le surissement sans bombage et le dégagement d'hydrogène sulfuré. En effet, il peut y avoir une acidification plus ou moins accentuée, sans bombage, dont la souche responsable peut être une bactérie anaérobie stricte, anaérobie facultative ou aérobie stricte. L'acidification la plus élevée est obtenue dans le cas de souches anaérobies facultatives. On observe rarement une acidification avec bombage. La croissance microbienne dans les boîtes incubées se traduit parfois par un simple trouble du jus accompagné ou non d'une légère alcalinisation. En outre, il peut y avoir à la fois un dégagement d'hydrogène sulfuré et une acidification du milieu. Ce type d'accident mixte peut provenir du métabolisme d'une seule souche, telle qu'une bactérie anaérobie stricte productrice d'H_2S et acidifiante, ou bien d'une association de souches, l'une produisant de l'hydrogène sulfuré et l'autre étant responsable de l'acidification du milieu. Enfin l'accident typique avec un dégagement d'hydrogène sulfuré peut représenter le métabolisme d'une seule souche anaérobie stricte.

L'étude bactériologique des boîtes analysées en fonction de la durée d'incubation à 55°, résumée dans le tableau 6, fait ressortir qu'il existe parfois quelques cas où des spores revivifiables sont restées sans germer dans les boîtes étuvées. Le pourcentage des boîtes incubées 10 jours qui présentent ce phénomène est de 5,2 p. 100. Il s'élève à 17,5 p. 100 dans le cas des boîtes incubées 2 ou 5 jours. Le phénomène d'autostérilisation, s'il existe, n'a qu'une importance relative, puisque dans les boîtes présentant les caractères typiques d'un accident de fabrication d'origine bactérienne (après 10 jours d'incubation) les bactéries ne sont pas revivifiables dans 16,2 p. 100 des cas seulement. Encore est-il possible de supposer que les milieux de culture utilisés ne conviennent pas à leur développement. D'ailleurs, toutes les souches aérobies et anaérobies facultatives ont pu être réensemencées avec succès après 15 jours d'incubation à 55° dans les milieux d'enrichissement. Par contre, les souches anaérobies strictes semblent beaucoup plus fragiles. Un certain nombre d'entre elles

TABLEAU 5. — *Répartition en pourcentage des accidents de fabrication en fonction du pH du jus et des caractéristiques des bactéries responsables* (types respiratoires, production d'acides organiques, dégagement d'hydrogène sulfuré)

Caractères des souches		pH du jus prélevé après l'ouverture de la boîte								Total en %
Types respiratoires	Caractères biochimiques	> 6,20	6,20 à 6,01	6,00 à 5,81	5,80 à 5,61	5,60 à 5,41	5,40 à 5,21	5,20 à 5,01	< à 5,00	
Anaérobies strictes seules	H_2S +	5,1	5,1	8,2	6,1	5,1	0	0	0	29,6
	H_2S + et H_2S 0	2,0	6,1	4,1	5,1	4,1	2,0	1,0	0	24,4
	H_2S 0	3,1	0	1,0	5,3	3,1	1,0	0	0	13,5
Anaérobies strictes + anaérobies facultatives ou aérobies strictes	H_2S + Acide +	0	2,0	0	0	0	0	0	0	2,0
	H_2S 0 H_2S + Acide +	1,0	1,0	1,0	0	0	0	0	0	3,0
	H_2S 0 Acide +	1,0	0	0	0	0	0	0	0	1,0
Anaérobies facultatives seules	Acide +	3,1	1,0	3,1	1,0	0	0	1,0	3,1	12,3
Aérobies strictes seules	Acide +	2,0	3,1	7,1	2,0	0	0	0	0	14,2
Répartition des souches en p. 100		17,3	18,3	24,5	19,5	12,3	3,0	2,0	3,1	100

Caractères des souches :
H_2S + = produisant de l'hydrogène sulfuré
H_2S 0 = ne produisant pas d'hydrogène sulfuré
Acide + = fermentant le glucose et le fructose avec production d'acides organiques.

Acide + = fermentant le glucose et le fructose avec production d'acides organiques.

TABLEAU 6

Étude bactériologique des accidents de fabrication en fonction de la durée d'incubation des boîtes et des caractéristiques du jus après l'ouverture
(les résultats numériques correspondent au nombre de boîtes observées dans chaque cas)

Durée de l'incubation à 55°	État des boîtes après l'ouverture	Souches pures dans les milieux d'enrichissement				Souches en mélange dans les milieux d'enrichissement					Aucun développement dans les milieux d'enrichissement	Total dans chaque cas
		AN H_2S +	AN H_2S 0	A acide +	AF acide +	AN H_2S + H_2S 0	AN H_2S + A ou AF acide +	AN H_2S 0 A ou AF acide +	AN H_2S + H_2S 0 A ou AF acide +	A et AF acide +		
2	N			2	2						8	12
	D		1		1						2	4
	H_2S +	3			1						2	6
	Acide				1							1
	Total.....	3	1	2	5						12	23
5	N		1	9				1			19	30
	D			6				1				7
	H_2S +	11				4	1		2		2	20
	Acide		3	1	1						1	6
	Total.....	11	4	16	1	4	1	2	2		22	63

TABLEAU 6 (suite)

Durée de l'incubation à 55°	État des boîtes après l'ouverture	Souches pures dans les milieux d'enrichissement				Souches en mélange dans les milieux d'enrichissement					Aucun développement dans les milieux d'enrichissement	Total dans chaque cas
		AN H_2S +	AN H_2S 0	A acide +	AF acide +	AN H_2S + H_2S 0	AN H_2S + A ou AF acide +	AN H_2S 0 A ou AF acide +	AN H_2S + H_2S 0 A ou AF acide +	A et AF acide +		
10	N	2		3		1					29	35
	D	2	1	4	1					1	10	19
	H_2S +	13				19			1		5	38
	Acide		7	7	3	2				2	4	25
	Total.....	17	8	14	4	22			1	3	48	117
Total général		31	13	32	10	26	1	2	3	3	82	203

Caractéristiques des jus
- N = Normal
- D = Trouble
- H_2S + = Odeur d'hydrogène sulfuré
- Acide = pH < 6,0

Caractères des souches
- AN = Anaérobies strictes
- AF = Anaérobies facultatives
- A = Aérobies strictes

- H_2S + = produisant de l'hydrogène sulfuré
- H_2S 0 = ne produisant pas d'hydrogène sulfuré
- Acide + = fermentant le glucose et le fructose avec production d'acides organiques

n'ont pas été revivifiables après une subculture dans les divers milieux de sporulation. Il faut également noter que dans 17,3 p. 100 des boîtes, on a pu mettre en évidence la présence d'un mélange de souches qu'il a été parfois impossible de séparer à l'aide des méthodes classiques par suite de l'absence du développement des colonies dans les milieux gélosés. Cependant, quelquefois l'ensemencement de ce mélange dans un milieu de sporulation a permis d'obtenir après un certain temps d'incubation une culture pure, ce qui conduit à penser qu'il y a une spécificité du milieu de sporulation pour certaines bactéries thermophiles anaérobies strictes.

En conclusion, sur 203 boîtes analysées, 77 paraissent intactes après 2-5 ou 10 jours d'incubation à 55° (21 d'entre elles cependant hébergent des spores revivifiables), 64 ont une odeur nette d'hydrogène sulfuré, 32 un pH acide, et 30 un jus simplement trouble. Parmi les 126 boîtes altérées, on a pu isoler et identifier les souches responsables des accidents dans 100 cas. Parmi les souches identifiées, certaines d'entre elles n'étaient pas jusqu'alors considérées comme capables de produire des spores très thermorésistantes.

Reçu pour publication en juin 1968.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué avec l'aide financière du Centre technique des Conserves de Produits agricoles sur des crédits qui ont été accordés à ce dernier par l'interprofession « Champignons de Paris ». Nous remercions également les industriels dont la collaboration bénévole et suivie a permis la réalisation de ce travail.

SUMMARY

STUDY OF DEFECTS IN THE MANUFACTURE OF TINNED CULTIVATED MUSHROOMS (« AGARICUS HORTENSIS ») CAUSED BY THERMOPHILE BACTERIA

I. — INVESTIGATION ON RESPONSABLE STRAINS

After opening under aseptic conditions 203 tins from different factories which had been incubated from 2 to 5 or 10 days at 55°C, the strains responsible for manufacturing defects were isolated. It was possible to identify some of them : *Bacillus circulans, Bacillus stearothermophilus, Clostridium nigrificans, Caduceus thermophilus alpha, Plectridium thermoaceticum, Terminosporus thermosaccharolyticus, Caduceus thermoaerogenes.*

These strains, singly or in association, clouded the liquid, acidified it or provoked a release of sulphur-bearing water. The respective percentages of these various defects have been determined in relation to the responsible strains. Spores which could be revivified after subculture were found in 21 unopened tins.

RESUMEN

ESTUDIO DE LOS ACCIDENTES DE FABRICACION DE LAS CONSERVAS DE SETAS DE CULTIVO (« AGARICUS HORTENSIS ») PROVOCADOS POR LAS BACTERIAS TERMOFILAS

Después de la apertura aséptica de 203 latas de conservas, procedentes de dos fábricas diferentes, y una vez procedido a la incubación de 2-5 ó 10 días a 55°C, se han aislado las estirpes responsables de los accidentes de fabricación. Algunas de las mismas han podido ser identificadas : *Bacillus cir-*

culans, Bacillus stearothermophilus, Clastrodium nigrificans, Caduceus thermophilus alpha, Plectridium thermoaceticum, Terminsoporus tjermossaccharolyticus, Caduceus thermoaerogenes.

Estas estirpes, aisladas o en combinación, enturbian el jugo, le ecidifican o producen un desprendimiento de hidrógeno sulfurado. Se han determinado los porcentajes respectivos de estos distintos accidentes en relación con las estirpes responsables. En 21 latas intactas, se encuentran esporos revivificables después de subculturas.

RASSIUNTO

STUDIO DEGLI ACCIDENTI DI FABBRICAZIONE DELLE CONSERVE DI FUNGHI DI FUNGAIA (« AGARICUS HORTENSIS ») PROVOCATI DA BATTERI TERMOFILI

Dopo l'apertura asettica di 203 scatole provenienti da due officine differenti, che erano state incubate 2-5 o 10 giorni a 55°, si sono isolati i ceppi responsabili degli accidenti di fabbricazzione. Certuni hanno potuto essere identificati : *Bacillus circulans, Bacillus stearothermophilus, Clostridium nigrificans, Caduceus thermophilus alpha, Plectridium thermoaceticum Terminosporus thermosaccharolyticus, Caduceus thermo aerogenes.*

Questi ceppi soli o in associazione, intorbidano il succo, l'acidificano o producono uno sprigionamento d'idrogeno solforato. Si sono determinate le percentuali rispettive di questi diversi accidenti in relazione con le fungaie responsabili. In 21 scatole intatte, si ritrovani delle spore che si possono revivificare dopo nelle sub-colture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allen M. B., 1953. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **17**, 125-173.

Bausum H. T., Matney T. S., 1965. Boundary between mesophiles and thermophiles. *J. Bacteriol.*, **90**, 50-53.

Breed R. S., Murray E. G. D., Smith N. R., 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1094 p., 7e éd., Williams and Wilkins éd., Baltimore.

Buttiaux R., Beerens H., Tacquet A., 1966. *Manuel de Techniques Bactériologiques*, 572 p., 2e éd. Éditions Médicales Flammarion, Paris.

Cheftel H., 1957. Aspects techniques de l'expertise des conserves. *Bull. nº 13, Labor. de Recherches des Ét J.-J. Carnaud et Forges de Basse-Indre*, 52 p., Gauthier-Villars, éd., Paris.

Christensen W. B., 1946. Urea decomposition as a means of differenciating Proteus and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.*, **52**, 461-466.

Frazier W. C., 1926. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Inform. Dis.* **39**, 302-309.

Hirsch A., Grinsted E., 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese. *J. Dairy Res.*, **21**, 101-110.

Latche J. C., 1963. Acides aminés libres des différentes parties du carpophore d'*Agaricus hortensis*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **257**, 2145-2147.

Ordal Z. J., 1957. In Halvorson H. O., *Spores*, p. 18-32, Publ. nº 5, American Institute of Biological Sciences, Washington D. C.

Perkins W. E., 1965. Production of Clostridial spores. *J. appl. Bacteriol.*, **28**, 1-16.

Prévot A. R., Turpin A ; Kaiser P., 1967. *Les Bactéries Anaérobies*, 2188 p., Dunod éd., Paris.

Smith N. R., Gordon R. E., Clark F. E., 1952. *Aerobic spore forming bacteria*. U. S. Dept Agric., Agric. Monograph nº 16, 148 p. Washington.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 189-206.

LES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES DU RAISIN

R. CORDONNIER, A. DUGAL
avec la collaboration technique de C. BIRON

Station de Technologie végétale,
École nationale supérieure agronomique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, 34 - Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Le raisin est doté d'un matériel enzymatique capable d'hydrolyser les protéines ; atteint de pourriture grise, il présente des activités quatre à cinq fois plus élevées. Celles-ci sont situées essentiellement dans les particules solides de la baie saine et dans le jus du raisin pourri.

Leur évolution au cours du développement du fruit, de la fermentation alcoolique et certaines de leurs propriétés d'intérêt technologique sont aussi précisées, leur thermorésistance notamment.

INTRODUCTION

Les phases de la vinification précédant la fermentation alcoolique ont une incidence certaine, mais encore relativement peu connue, sur la constitution des moûts et des vins, leur aptitude biologique, leur stabilité physico-chimique.

Parmi ces phases, la macération à chaud de la vendange et la macération en atmosphère carbonique des grains, prennent dans la pratique un développement qui met l'accent sur la nécessité de mieux connaître les phénomènes chimique, biochimique et physico-chimique qui se passent dans le raisin et le moût avant le départ de la fermentation alcoolique, sur la nécessité aussi de mieux connaître les constituants de la baie susceptibles d'intervenir, son équipement enzymatique notamment.

Ce que nous savons de cet équipement s'arrête pour l'instant essentiellement aux enzymes pectolytiques (MARTEAU, 1967) et aux oxydases (POUX, 1967) car l'importance de leurs effets technologiques est immédiatement perceptible, mais d'autres enzymes peuvent intervenir d'une façon sans doute plus discrète mais non moins importante.

Ainsi par exemple, l'augmentation du potentiel biotique des moûts par mace tion carbonique ou macération à chaud des vendanges (travail en cours au labo toire) pose le problème des modifications qualitative et quantitative de la mati première et des agents responsables de ces transformations.

C'est dans cette optique que nous avons abordé l'étude des protéases éventue ment présentes dans la baie de raisin.

Pour l'instant, nous ne savons pratiquement rien sur ces enzymes, sinon que jus de raisin frais possèdent une certaine activité protéolytique (PANTANELLI, 19 BAGLIONI et *al.*, 1937).

Ce mémoire est consacré aux travaux réalisés dans le but de mettre en évide les activités protéolytiques du raisin, leur répartition dans la baie, leur évolution cours du développement du fruit et de la fermentation alcoolique des jus ainsi q certaines de leurs propriétés d'intérêt technologique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. — *Matériel végétal*

Les expériences ont été conduites soit sur des jus de raisin frais, soit sur des poudres acéton alcooliques de baies.

Jus pulpeux. — Les grains de raisin détachés de la grappe, lavés à l'eau distillée et séchés, gel et décongelés deux fois, sont passés à un extracteur de jus de fruit, de type centrifuge, débarras de sa toile filtrante de façon à obtenir la plus grande partie de la pulpe de la baie exempte de pépi et pellicules.

Jus limpides obtenus par centrifugation et filtration des jus pulpeux.

Poudres acétono-alcooliques. — Étant donné le temps très bref pendant lequel on dispose matériel frais, nous avons mis au point une technique de stabilisation des échantillons qui nous permis de suivre l'évolution des activités protéolytiques au cours du développement du fruit, le répartition dans celui-ci, ou encore de réaliser un stock suffisant de matériel d'étude.

L'acétone, utilisée suivant les techniques classiques de stabilisation des matériels végéta (NASON, 1955), donne, avec les raisins mûrs, des poudres de consistance gommeuse, difficileme récupérables et très hygroscopiques ; l'éthanol permet de se débarrasser de la plus grande part du matériel hygroscopique, mais son rendement en activités récupérées est très inférieur à celui l'acétone. Cependant, en combinant ces deux agents de précipitation, on obtient des poudres facil à sécher et contenant la majeure partie des activités initiales.

La technique est la suivante : un poids P de matériel végétal refroidi à — 1° environ, est pla dans un bécher de volume convenable, écrasé sommairement au mortier dans le cas des grains, p recouvert d'un volume d'acétone à — 5°C, égal à quatre fois le poids du matériel mis en œuvre traité à un homogénéiseur du type Ultra-Turax pendant une minute. Après addition d'un deuxiè volume d'acétone identique au premier, on homogénéise une deuxième fois pendant une minute le mélange est laissé au repos une demi-heure.

Le précipité, récupéré par filtration sous vide sur Büchner, est lavé d'abord deux fois à l'étha 96 p. 100 — 5°C en traitant une minute chaque fois le précipité à l'homogénéiseur dans un volu d'éthanol égal à quatre fois le poids initial du matériel mis en œuvre, puis deux fois à l'éther.

Ces opérations sont conduites le plus rapidement possible dans un congélateur utilisé en paillas froide, à — 5°C au niveau des manipulations.

L'utilisation d'acétone et d'éthanol à des températures inférieures à — 5°C, rend plus diffic l'élimination des matériels gommeux et hygroscopiques.

Ont été ainsi conditionnés sous forme de poudre acétono-alcoolique, des grains entiers, et leu différents constituants : pépins, pulpes et pellicules.

Les pellicules sont isolées par pression et friction des grains entre deux doigts.

De tous les constituants du grain, c'est la pulpe débarrassée du jus par centrifugation, qui don les poudres les plus actives.

B. — *Mesure des activités protéolytiques*

La préparation enzymatique, ajustée à un certain pH, est mise à incuber à une température donnée avec un volume déterminé de substrat. Aux temps 0, 1, 2,... *n* des parties aliquotes du mélange d'incubation sont précipitées par l'acide trichloracétique (T. C. A.).

La protéolyse est mesurée sur le filtrat trichloracétique (F. T. C. A.) en dosant l'azote solubilisé sous forme (*a*) d'azote total par la méthode de Kjeldahl, (*b*) d'acides aminés phénols par la méthode de Anson (1938), (*c*) d'acides aminés par la méthode de Moore et Stein (1948-1954).

Les techniques colorimétriques sont plus rapides mais, en raison des nombreuses substances interférantes pouvant se présenter dans des milieux aussi complexes que les moûts et les poudres de raisin, nous avons retenu la méthode Kjeldahl de détermination de l'azote total dont la sensibilité est suffisante et qui nous a donné les résultats les plus fidèles.

Cependant la méthode Anson est la plus pratique pour contrôler rapidement l'activité des préparations enzymatiques.

Parmi les substrats protéiques testés, l'hémoglobine (*Hemoglobine denatured Nutritional Biochemicals Corporation*) a été choisie de préférence à l'ovalbumine et à la caséine Hammarsten.

Modes opératoires

a) *Dans les jus.*

70 ml de jus (pulpeux ou clarifié) sont ajustés à pH 2,0 par 0,2 à 0,4 ml d'HCl pur, additionnés de 3,85 ml de tampon citrate disodique HCl 2 mol de pH 2,0 et amenés au volume final de 77 ml avec de l'eau désionisée.

Une prise de 70 ml de ce jus tamponné est mise dans un erlenmeyer de 150 ml avec 7 ml d'une solution à pH 2,0 d'hémoglobine à 5 p. 100 dans du tampon citrate 0,1 mol., plus quelques gouttes de toluène. On a ainsi un mélange d'incubation ayant une concentration de 0,5 p. 100 en hémoglobine et de 0,1 mol en tampon.

Celui-ci est mis à incuber dans un thermostat réglé à 55°C.

Aux temps 0-2, 4, 8 h, pour les jus sains, et 0,20, 40, 60, 90 minutes pour les raisins pourris, on pipette 15 ml du mélange dans 5 ml T. C. A. 20 p. 100 glacé.

Après une demi heure de repos, on filtre ; l'azote total est dosé sur 10 ml F. T. C. A. et la tyrosine, sur 0,2 ml.

Les résultats sont exprimés en microéquivalents d'azote ou micromolécules de tyrosine libérés par ml de jus initial.

b) *Dans les poudres acétono-alcooliques.*

L'extraction du matériel enzymatique de ces poudres s'étant révélée difficile et peu quantitative, nous avons mesuré les activités directement sur les poudres. On obtient ainsi des préparations plus actives et des résultats plus reproductibles.

L'extrait enzymatique, E, est préparé de la façon suivante :

deux grammes de poudre sont mis en suspension dans 10 ml d'eau désionisée contenant la quantité d'HCl N nécessaire pour amener le pH à 2,3. On rajoute à cette suspension 10 ml d'une solution à pH 2,3 d'hémoglobine à 2 p. 100 dans du tampon citrate HCl 0,2 mol, et quelques gouttes de toluène.

Un rapport P/V (poids de poudre/volume d'eau HCl) de 5 convient pour les poudres de raisin à partir de la véraison mais il doit être porté à 10 ou 15 pour les poudres de raisins au stade herbacé ou de certains cépages hybrides qui absorbent beaucoup d'eau.

Le mélange enzyme-substrat, ayant une concentration de 1 p. 100 en hémoglobine et de 0,1 mol en tampon, est mis à incuber dans un thermostat réglé à 70°C.

Aux temps 0, 2, 4, 8 h, on pipette 4 ml du mélange dans 8 ml de T. C. A. 7,5 p. 100 glacé.

Après une demi-heure de repos, on filtre ; l'azote total est dosé sur 5 ml F. T. C. A., la tyrosine sur 0,5 ml et les acides aminés par la méthode de Moore et Stein sur 1 ml dilué 30 fois.

Les résultats sont exprimés en microéquivalents d'azote, micromolécules de tyrosine ou micromolécules de leucine libérés par ml d'extrait enzymatique E et par gramme de poudre.

Connaissant le poids de poudre donné par grain de raisin et par gramme de pellicules, pulpes ou pépins, ils peuvent être ramenés à la baie ou à l'unité de poids de ses éléments constitutifs.

Ces estimations quantitatives sont possibles dans la limite des temps d'incubation où l'hydrolyse est proportionnelle au temps et à la quantité d'enzyme mise en œuvre. C'est la raison pour laquelle toutes les mesures d'activités sur jus et sur poudre acétono-alcoolique, ont été faites sur plusieurs temps de façon à apprécier l'allure de la cinétique de la réaction.

RÉSULTATS

A. — *Mise en évidence des activités protéolytiques du raisin*

Des jus pulpeux d'*Aramon* et de *Carignan*, sains ou pourris, additionnés d'hémoglobine, libèrent dans le milieu des quantités d'azote soluble croissantes en fonction du temps (fig. 1). En l'absence de protéine (*Carignan* sain contrôle), les quantités d'azote libéré sont beaucoup plus faibles (fig. 1) par ailleurs l'hydrolyse thermique du substrat est encore pratiquement nulle après huit heures à 70°C.

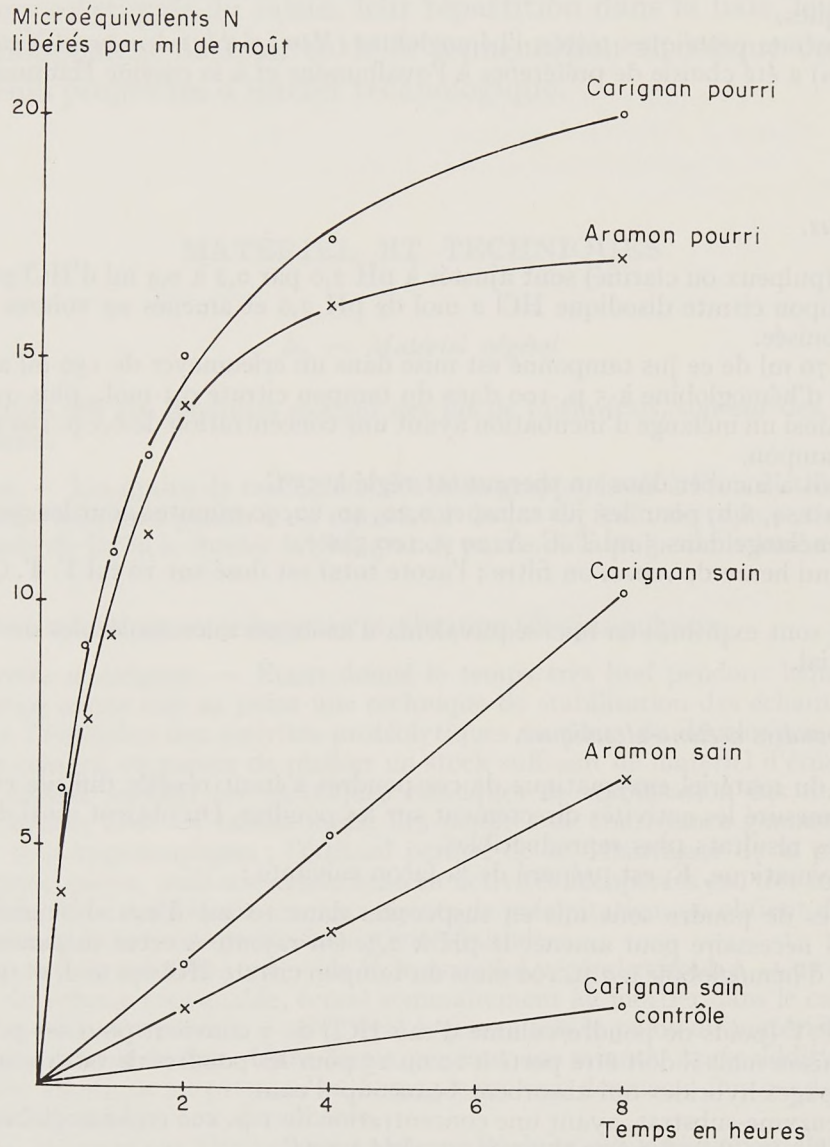


FIG. 1. — *Activités protéolytiques des raisins: hydrolyse de l'hémoglobine par les moûts de* Carignan *et d'*Aramon *sains et pourris, à pH 2,0 et 50°C*

Les raisins sont donc bien dotés d'activités protéolytiques.

Si l'on compare les activités au temps deux heures, on voit que les jus pulpeux de raisins pourris ont une activité cinq à dix fois plus élevée que celle des jus de raisins sains.

Les activités sont maximales à pH 2,0 (fig. 2) et à 55°C (fig. 3) dans les jus et à pH 2,3 (fig. 4) et 70°C (fig. 5) dans les poudres acétono-alcooliques.

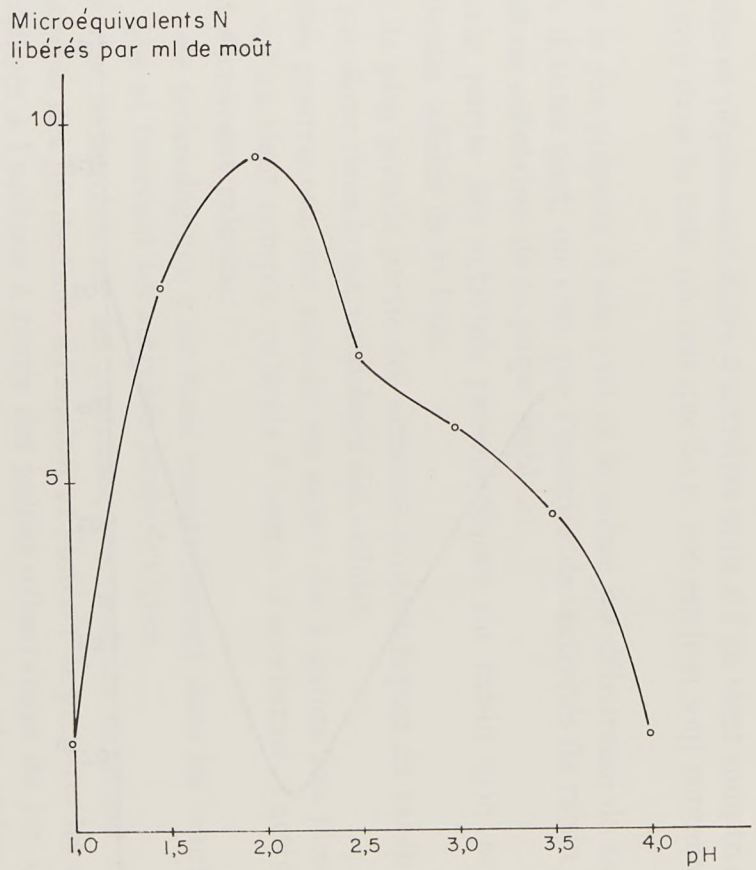


FIG. 2. — *Effet du pH sur l'activité protéolytique des moûts : activités mesurées à 50°C après 8 heures d'hydrolyse*

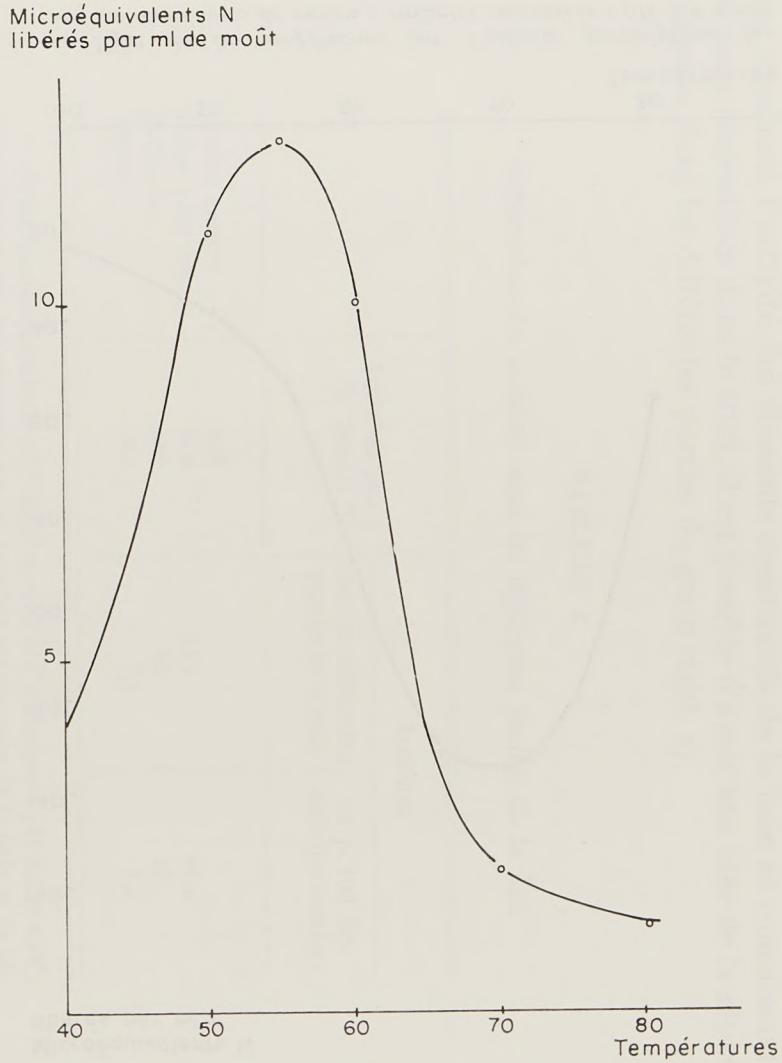


FIG. 3. — *Effet de la température sur l'activité protéolytique des moûts : activités mesurées à pH 2,0 après 8 heures d'hydrolyse*

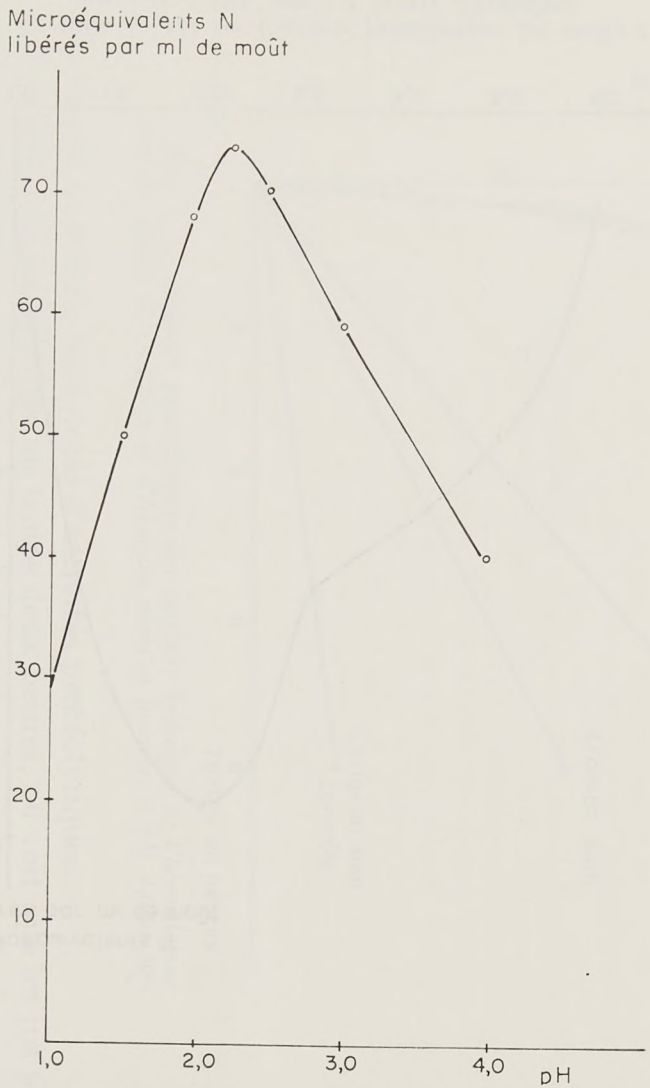


FIG. 4. — *Effet du pH sur l'activité protéolytique des poudres acétono-alcooliques de raisin : activités mesurées à 65°C après 4 heures d'hydrolyse*

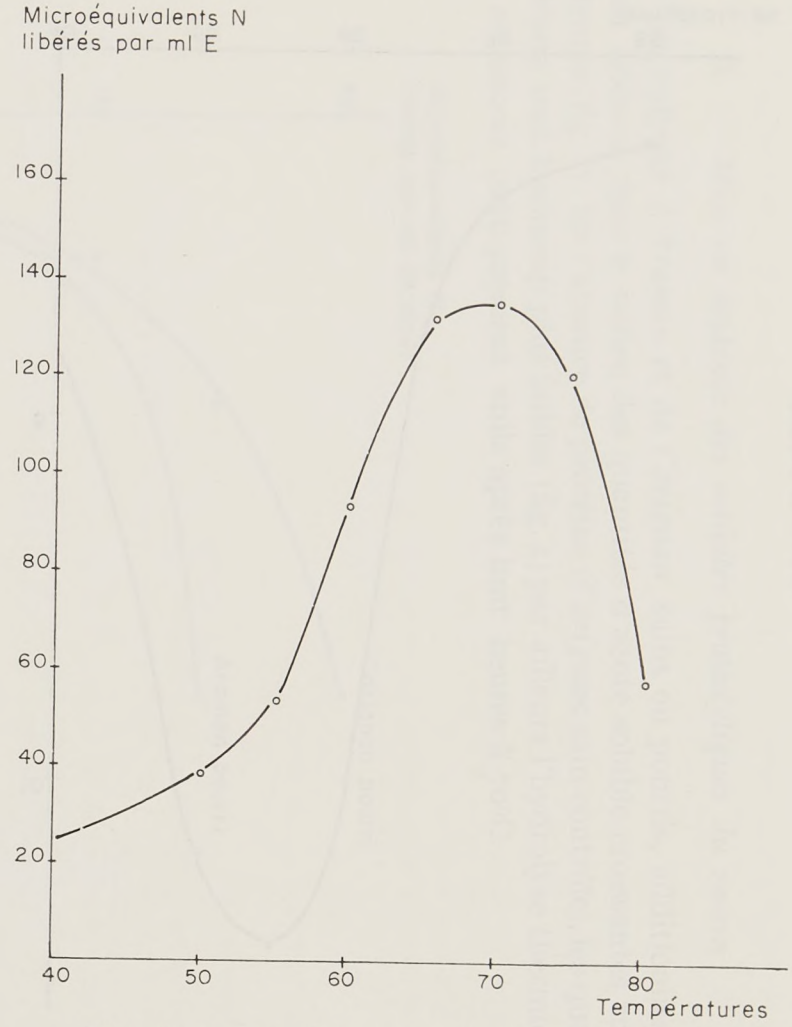


FIG. 5. — *Effet de la température sur l'activité protéolytique des poudres acétono-alcooliques de raisin : activités mesuréees à pH 2,0 après 4 heures d'hydrolyse*

B. — *Localisation des activités dans la baie*

En mesurant l'activité des éléments constitutifs de la baie et connaissant leurs proportions respectives dans le fruit, il est possible d'avoir une idée de la répartition des activités dans les différentes parties du grain (tabl. 1).

TABLEAU I

Répartition des activités dans les différentes parties de la baie

	Activités par g de poudre (1)	Activités	
		dans les différentes parties de la baie	en p. 100 des activités totales
Grains entiers	880		
Pulpe plus jus....	550	455	81,6
Pellicules.....	650	95	17
Pépins	365	7,5	1,4

(1) En microéquivalents d'N libéré après 4 h d'hydrolyse à pH 2,3 et 65°C. Ces activités ont été mesurées sur les poudres acétoniques de la baie et de ses différents constituants.

Pulpe, pellicules et pépins sont dotés d'activités mais si l'on tient compte de leur importance respective dans la baie, on voit que 80 p. 100 environ sont contenus dans le jus pulpeux.

Si on analyse le jus pulpeux d'une part et le même jus débarrassé de sa pulpe par centrifugation d'autre part, on voit que l'essentiel des activités du raisin sain se trouve dans les débris cellulaires de la pulpe (tabl. 2).

La plus grande partie des activités protéolytiques du raisin sain est donc associée aux particules solides de la baie.

Au contraire, la plus grande partie des activités protéolytiques du raisin pourri se trouve dans le jus, donc dans le suc vacuolaire des cellules.

Les jus clarifiés pourris ont une activité au moins dix à quinze fois plus élevée que les jus sains si l'on tient compte qu'après 8 heures d'incubation, l'activité des moûts pourris est fortement ralentie.

Du point de vue technologique c'est donc essentiellement dans les bourbes des vendanges saines que se trouvent les activités protéolytiques.

Du point de vue recherches sur les protéases, ces résultats montrent l'importance de la préparation des jus destinés à l'analyse et l'intérêt de préparer les extraits enzymatiques stabilisés à l'acétone à partir des pulpes débarrassées du jus. Celles-ci donnent en effet des poudres acétono-alcooliques cinq à six fois plus riches que les baies entières.

TABLEAU 2

Activités des jus avec et sans la pulpe

	Jus + Pulpe	Jus	% d'activité dans le jus
Raisins sains			
Carignan.....	8,8	0,9	10,2
Carignan.....	9,6	0,9	9,3
Cinsault.....	8,3	0,3	3,6
Aubun	3,9	0,9	23,0
Aramon	6,4	1,3	20,0
Aramon	6,4	2,2	34,0
Raisins pourris			
Carignan.....	18,9	13,7	72
Carignan.....	21,5	18,0	83,7
Cinsault.....	17,0	14,7	86
Aramon	17,6	17,9	100

Activités exprimées en microéquivalents N libérés/ml de jus en 8 h d'hydrolyse à pH 2,0 et 55°C.

TABLEAU 3

Activités protéolytiques de différents cépages

I — Cépages rouges		II — Cépages blancs	
Vinifera		*Vinifera*	
Carignan École.....	3 580 (30)	*Ugni blanc* École	1 320 (6,17)
Carignan { Jarras 1	2 100 (13)	*Ugni blanc* Jarras	5 050 (32,4)
Carignan { Jarras 2	5 050 (34)	*Clairette* École	1 680 (18,7)
Grenache École	1 200 (10,5)	*Clairette* Jarras.....	1 815 (16,3)
Grenache Jarras	3 030 (18,6)	*Piqpoul blanc* École.....	1 380 (13,1)
Cinsault École.....	5 800 (27,2)		
Cinsault Jarras	4 900 (20,1)		
Aramon École	8 000 (37)		
Syrah Jarras	1 490 (15)		
Hybrides		*Hybrides*	
18.315 Vassal	2 220 (21,7)	*12.375* Vassal	1 520 (12,6)
7120 Vassal	2 730 (22,5)	*22 A Baco* Vassal	2 700 (26,2)
7053 Vassal	2 600 (31,3)	*4986* Vassal	1 440 (18,3)
5455 Vassal	2 910 (34,7)		
Isabelle École	1 530 (12,6)		

Activités exprimées en microéquivalents d'azote libérés par 50 grains après 4 h d'hydrolyse à 65°C et pH 2,3.
Les nombres entre parenthèses expriment les activités par gramme de baie.

C. — *Activités protéolytiques de différentes variétés de raisin*

Cinquante grains, de différentes variétés, récoltés à maturité sur différentes aires de production, ont été conditionnés sous forme de poudre acétono-alcoolique puis analysés.

Les résultats ont été exprimés par 50 grains et par gramme de baies de façon à se rendre compte au point de vue physiologique, de la richesse en activités des baies et au point de vue technologique, de la richesse protéasique par unité de poids de vendange (tabl. 3).

On n'observe pas de différence significative dans la richesse des baies en fonction des variétés *Vinifera* et *Hybrides* d'une part, en fonction des cépages rouges et blancs d'autre part.

Les écarts observés entre variétés ne sont pas plus importants en effet que les écarts, pour une même variété, entre deux lots prélevés dans des aires de production différentes.

En d'autres termes, des facteurs qui n'ont pas été étudiés : sol, climat, ou potentiel végétatif et fumure, paraissent intervenir au moins autant que le facteur cépage.

D. — *Évolution des activités au cours du développement du grain et de la maturation*

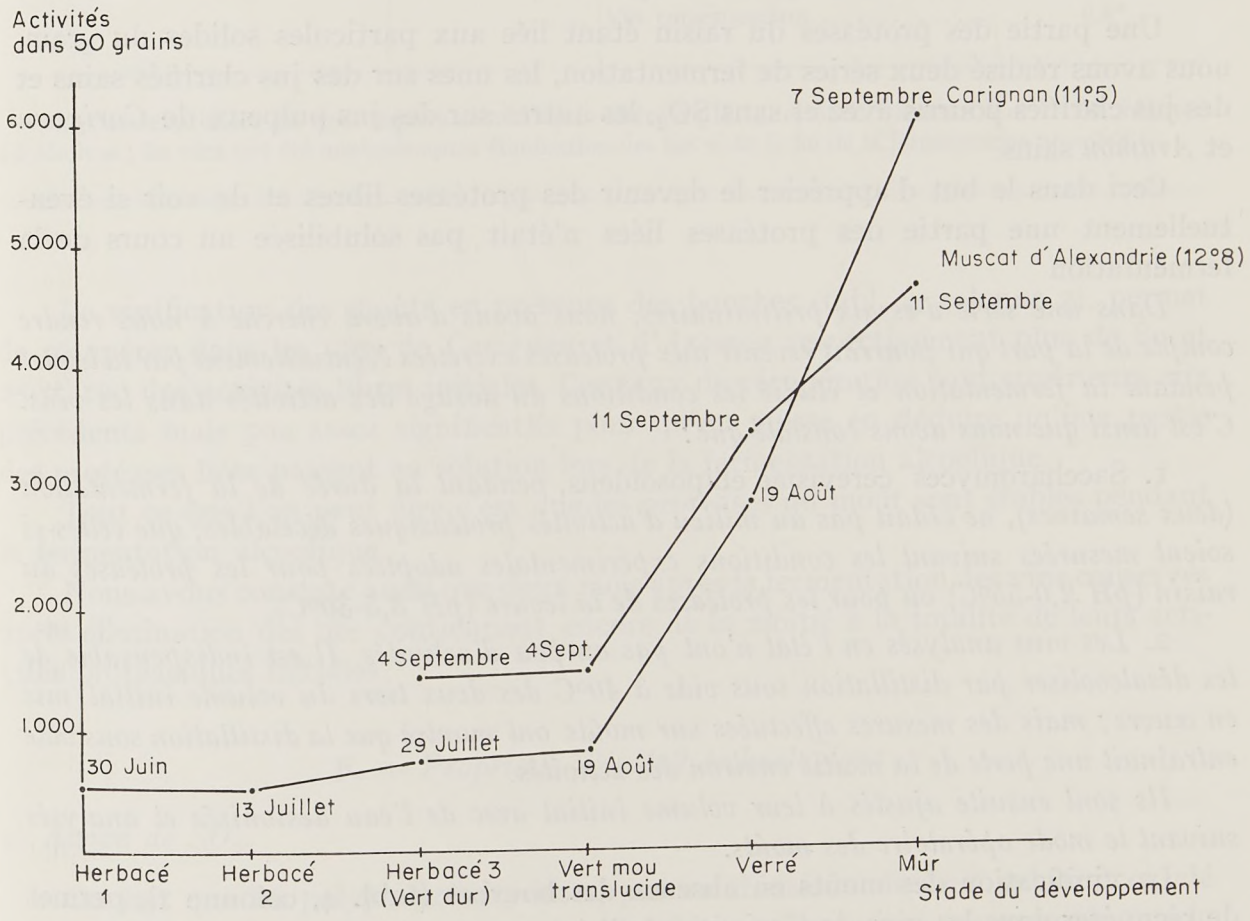


FIG. 6. — *Évolution des activités dans la baie au cours de son développement. Activités mesurées à pH 2,3 et 65°C après 4 heures d'hydrolyse*

Des baies ont été prélevées à différents stades de développement, pesées et conditionnées sous forme de poudre acétono-alcoolique dont on a mesuré le poids de façon à rapporter les activités trouvées à l'unité de poids de poudre et à la baie.

A partir de la véraison, les grains n'ont pas été prélevés au hasard mais triés sur chaque grappe en fonction de leur état physiologique : vert dur, vert mou et translucide, verré (7 à 8° d'alcool puissance), mûr (11° pour le *Carignan*, 12°-13° pour le *Muscat d'Alexandrie*) (fig. 6).

Les activités sont présentes dans le grain dès le premier prélèvement au stade herbacé et évoluent peu jusqu'à la véraison. C'est à partir de celle-ci qu'il emmagasine son matériel protéolytique : la baie de raisin est quatre à dix fois plus active à maturité qu'avant la véraison. Ces activités se conservent ensuite pendant la surmaturation comme nous avons pu le constater en analysant des échantillons de baies d'*Aramon* et *Carignan* titrant 12 à 14° d'alcool puissance prélevés en octobre et novembre.

Au cours de son développement, le raisin s'enrichit en même temps en matériel et en azote insoluble dans l'acétone, en azote donc essentiellement protéique.

Du point de vue préparatif, c'est à demi-véraison (baie titrant 7 à 8° d'alcool puissance) que l'on obtient les poudres de raisin les plus actives. C'est aussi à ce stade qu'elles sont le plus facile à préparer mais à maturité le rendement du raisin en poudre acétono-alcoolique est environ deux fois plus important.

E. — *Évolution des activités au cours de la fermentation alcoolique*

Une partie des protéases du raisin étant liée aux particules solides du grain, nous avons réalisé deux séries de fermentation, les unes sur des jus clarifiés sains et des jus clarifiés pourris avec et sans SO_2, les autres sur des jus pulpeux de *Carignan* et *Aramon* sains.

Ceci dans le but d'apprécier le devenir des protéases libres et de voir si éventuellement une partie des protéases liées n'était pas solubilisée au cours de la fermentation

Dans une série d'essais préliminaires, nous avons d'abord cherché à nous rendre compte de la part qui pourrait revenir aux protéases excrétées éventuellement par la levure pendant la fermentation et étudié les conditions du dosage des activités dans les vins. C'est ainsi que nous avons constaté que :

1. Saccharomyces cerevisiae elliposoïdeus, *pendant la durée de la fermentation (deux semaines), ne cédait pas au milieu d'activités protéasiques décelables, que celles-ci soient mesurées suivant les conditions expérimentales adoptées pour les protéases du raisin (pH 2,0-55°C) ou pour les protéases de la levure (pH 3,5-30°C).*

2. *Les vins analysés en l'état n'ont pas ou peu d'activités. Il est indispensable de les désalcooliser par distillation sous vide à 40°C des deux tiers du volume initial mis en œuvre ; mais des mesures effectuées sur moûts ont montré que la distillation sous vide entraînait une perte de la moitié environ des activités.*

Ils sont ensuite ajustés à leur volume initial avec de l'eau désionisée et analysés suivant le mode opératoire des moûts.

La vinification des moûts en absence des bourbes (tabl. 4, colonne 1), permet de récupérer dans les vins de *Carignan* et d'*Aramon*, respectivement 50 à 60 p. 100 et 20 p. 100 des activités initiales.

Si l'on tient compte de ce que la désalcoolisation des vins avant l'analyse, entraîne une perte de 40 à 50 p. 100, on peut en déduire que la fermentation entraîne peu ou pas de perte en protéases libres.

TABLEAU 4

Évolution des protéases pendant la fermentation

	Activités par ml de moût et de vin		
	Protéases libres		Protéases liées
Carignan sain		*Carignan sain*	
Moût limpide	2,4*	Moût pulpeux	9,6*
Vin correspondant	1,3*	Activités libres du moût mesurées après centrifugation	1,9*
Carignan pourri		Vin correspondant	1,6*
Moût limpide vinifié sans SO_2	10,6**		
Vin correspondant	6,7**		
Moût limpide vinifié avec 100 mg SO_2/l	10,5**		
Vin correspondant	6,7**		
Aramon pourri		*Aramon sain*	
Moût limpide vinifié sans SO_2	9,6**	Moût pulpeux	6,4*
Vin correspondant	1,9**	Activités libres du moût mesurées après centrifugation	2,2*
		Vin correspondant	0,6*

Activités exprimées en microéquivalents d'azote libéré à pH 2,0 et 55°C * après 8 h et ** 60 minutes d'hydrolyse ; les vins ont été analysés après élimination des lies sitôt la fin de la fermentation alcoolique.

La vinification des moûts en présence des bourbes (tabl. 4, colonne 2), permet de récupérer dans les vins de *Carignan* et d'*Aramon* respectivement plus de 80 et 25 p. 100 des activités libres initiales. Ces taux de récupération sont supérieurs aux précédents mais pas assez significatifs pour qu'on puisse en déduire qu'une partie des protéases liées passent en solution lors de la fermentation alcoolique.

Tout ce que l'on peut dire c'est que les protéases du moût sont stables pendant la fermentation alcoolique.

Nous avons constaté aussi que deux mois après la fermentation, les vins conservés après élimination des lies contiennent encore de la moitié à la totalité de leurs activités protéasiques initiales.

F. — *Propriétés d'intérêt technologique*

a) *Action de SO_2.*

On sait que les polyphénol oxydases, par combinaison de leur substrat oxydé sur des enzymes, peuvent provoquer leur inhibition. C'est ainsi par exemple que la polygalacturonase de *vicia fabae* est inhibée par les produits de l'activité d'une phé-

nolase secrétée par un agent infectieux de cette plante, *Botrytis fabae* (Dveralle 1961). SO_2 peut donc agir sur les protéases du grain soit directement, soit indirectement en les protégeant contre les oxydases.

L'effet du SO_2 a été testé sur des moûts pulpeux, sains et pourris, de *Carignan* et d'*Aramon*, d'une part au pH optimal, 2,0, de la protéase dans le moût, et, d'autre part, à un pH moyen, 3,15, souvent rencontré dans la pratique œnologique.

TABLEAU 5

Effet du SO_2 sur les activités protéolytiques du raisin

	Activités mesurées à pH 2,0			Activités mesurées à pH 3,15		
	I — *Raisins sains*					
	Témoin	25 mg SO_2/l	50 mg SO_2/l	Témoin	25 mg SO_2/l	50 mg SO_2/l
Aramon	1,3 1,6	3,2 2,6	2,4 1,9	4,8	5,8	5,8
Carignan	2,6 3,5	6,1 5,2	2,8 4,8	4,8	7,1	6,7
	II — *Raisins pourris*					
	Témoin	50 mg SO_2/l	100 mg SO_2/l	Témoin	50 mg SO_2/l	100 mg SO_2/l
Aramon	14 18 9	15 18	15 15 9	10,0	11,2	12
Carignan	15 19 8,0	17 17	15 16 7,0	10,6	11,5	12,2

Activités exprimées en microéquivalents d'azote libérés par ml de moût après 2 h d'hydrolyse à pH 2.0 et 55°C.

Les concentrations en SO_2 indiquées correspondent à celles réalisées dans le mélange d'incubation enzyme-substrat.

On observe un net effet activateur du SO_2 sur les raisins sains plus important à pH 2,0 qu'à pH 3,15 et à 25 mg qu'à 50 mg. Sur les raisins pourris, contrairement à ce qu'on aurait pu penser, cet effet activateur de SO_2 devient très faible à pH 3,15 et nul à pH 2,0.

Le SO_2 ne paraît avoir aucun effet protecteur de l'enzyme au cours de la fermentation des jus issus de raisins pourris (tabl. 4).

b) *Action de la bentonite.*

Un moût de *Carignan* et deux moûts d'*Aramon* pourris ont été traités après centrifugation et filtration par 1 gramme de bentonite par litre (Bentcoll'). Après

quinze minutes d'agitation mécanique, les moûts traités ont été centrifugés et analysés comparativement à leur témoin respectif.

TABLEAU 6

Action de la bentonite

	Activité/ml de moût	Activité résiduelle (%)
Carignan pourri		
Témoin	13,8	
Traité.....	7,3	47,5
Aramon pourri		
Expérience I		
Témoin	14	
Traité.....	6,4	45
Expérience II		
Témoin	14	
Traité.....	12,8	91

Activités exprimées en microéquivalents d'N libéré après 2 h d'hydrolyse à pH 2,0 et 55°C.

Dans les conditions expérimentales choisies, l'action de la bentonite est variable et le plus souvent faible, puisque un gramme de ce produit entraîne une perte d'activité de 50 p. 100 environ dans le meilleur des cas, ce qui est relativement peu, vue la quantité technologiquement importante du produit utilisé.

c) *Thermorésistance de l'enzyme.*

En présence de son substrat, l'enzyme paraît très résistante à la chaleur, puisque son activité hydrolytique se poursuit encore après 8 heures d'incubation à 70°C et 80°C. (fig. 7)

Mais son comportement peut être tout à fait différent en l'absence du substrat, dans son milieu naturel et au pH de celui-ci. C'est d'ailleurs la thermorésistance de l'enzyme dans ces conditions qui intéresse le technologue.

Elle a été testée à pH 3,15 aux températures de 50-60-70-80 et 90°C.

Des parties aliquotes de moût pulpeux, tamponné à pH 3,15 sont mises dans des matras de 200 ml et réparties deux à deux dans cinq bain-maries portés aux températures convenables, et agitées. Au bout des temps, quinze minutes et trente minutes, ils sont refroidis dans un bain de glace puis additionnés du substrat (hémoglobine 5 p. 100, pH 3,1) et incubés à 50°. Des prélèvements pour analyses sont faits aux temps 0, 2, 4, 8 heures.

La montée en température, suivant ce dispositif est de l'ordre de trois minutes.

Au pH du moût, l'enzyme est thermorésistante puisque après trente minutes de chauffage, elle ne perd rien de son activité à 50°C et seulement la moitié à 70°C. (fig. 8)

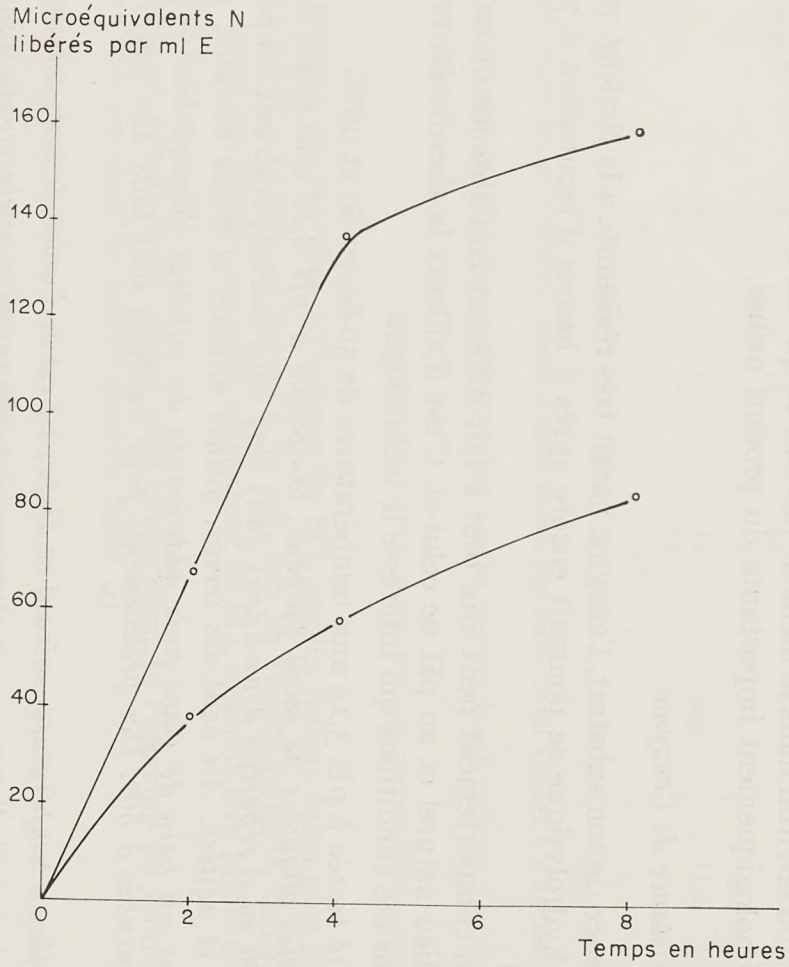


FIG. 7. — *Activités des poudres acétono-alcooliques en fonction du temps et de la température : activités mesurées à pH 2,0*

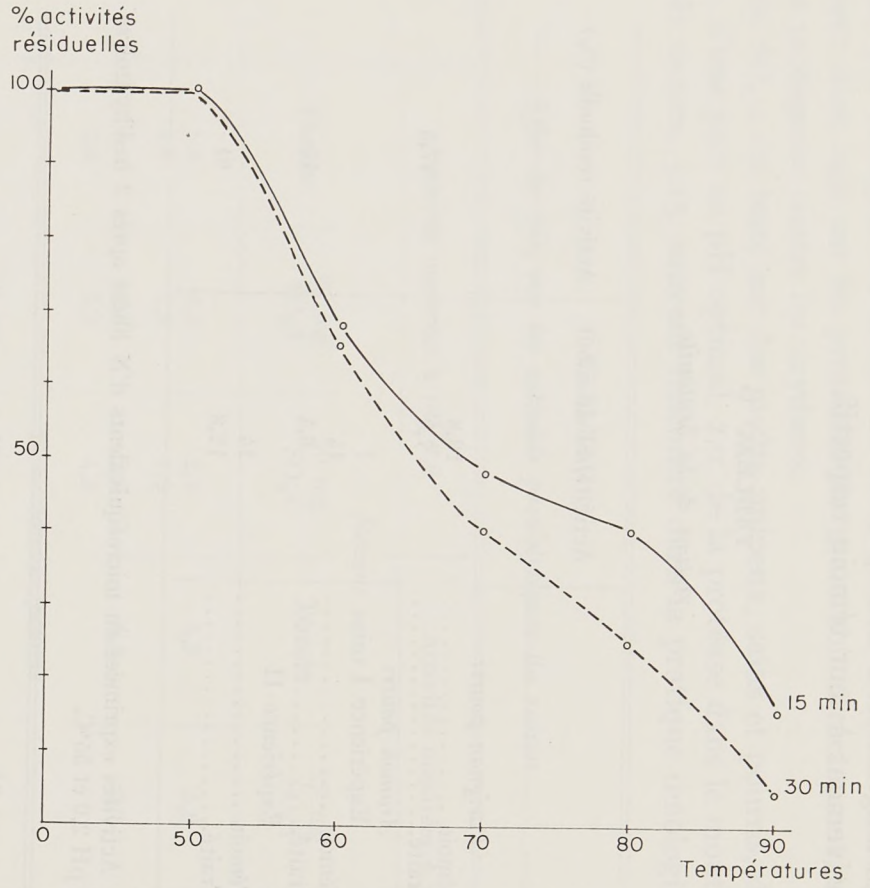


FIG. 8. — *Effet de la température et de la durée du chauffage sur l'activité protéolytique du jus de raisin : activités mesurées à pH 3,15 et 50°C après 4 heures d'hydrolyse*

Les courbes d'inactivation pour des durées de chauffage de quinze minutes et de trente minutes sont pratiquement confondues jusqu'à 60°C et ne se séparent nettement qu'à partir de 70°C.

Par ailleurs ces deux courbes d'inactivation présentent une rupture de pente aux environs de 50°C.

On peut en déduire que dans les moûts la température critique d'inactivation se situe aux environs de 50°C mais que la vitesse d'inactivation est faible jusqu'à 70°C.

Ces constatations sont intéressantes sur le plan technologique car ces températures et ces temps de chauffage correspondent à ceux utilisés dans la pratique œnologique.

DISCUSSION

Le raisin possède un matériel enzymatique capable d'hydrolyser les protéines à une vitesse maximale dans les moûts pour une température de 55°C et un pH de 2,0.

Ce matériel protéolytique est présent dans toutes les parties du grain (pulpe, pellicule, pépin) mais les 80 p. 100 sont situés dans les débris cellulaires de la pulpe.

Dans le raisin, la ou les protéase(s) sont donc, comme les polyphénoloxydases, essentiellement à l'état lié.

On les trouve dans la baie dès les premiers stades herbacés de son développement, mais c'est à partir de la véraison, c'est-à-dire au moment où le grain change de couleur, de structure et s'enrichit en sucre, qu'elles s'accumulent dans le fruit. En même temps s'accumule l'azote condensé complexe (insoluble dans l'acétone 90 p. 100) comme l'ont constaté Peynaud (1953) et Saulnier-Blache (1963).

Toutes les variétés de raisin en renferment mais la richesse des baies en activités paraît dépendre davantage de facteurs qui restent à préciser (climat, potentiel végétatif, fumure...) que du facteur variétal.

Les raisins atteints de pourriture grise ont des activités quatre à cinq fois plus élevées que les raisins sains, et celles-ci se trouvent essentiellement dans le jus de sorte que les jus de raisins pourris sont dix à quinze fois plus actifs que les jus sains.

Cette augmentation d'activité protéolytique des fruits contaminés par des moisissures et champignons est un fait qui a été constaté aussi sur d'autres fruits (Porter, 1966).

Mais les raisons en sont incertaines : l'agent infectieux peut intervenir directement par un apport d'enzymes exogènes, de nombreux champignons et moisissures étant dotés de protéases extracellulaires (Dion, 1950) mais aussi indirectement en libérant les protéases de fruit par désorganisation des structures cellulaires de la baie au moyen des équipements extracellulaires : cellulolytique, xylolytique (Hancock et Millar, 1965) ou pectolytique (Towaga, Kaji, 1967), qu'il possède.

Il est d'ailleurs connu que l'utilisation d'enzymes fungiques (cellulase, glucanase) améliore dans de fortes proportions le rendement d'extraction des protéines d'origine végétale (Abdo et King, 1967 ; Chandrasckaran et King, 1967).

Le déplacement des activités protéolytiques des particules cellulaires au suc vacuolaire dans le raisin atteint de pourriture grise est l'indice que *Botrytis cinerea*

pourrait intervenir non pas tant par des protéases extracellulaires que par l'action lysante d'autres enzymes, les enzymes pectolytiques en particulier dont on sait qu'il est pourvu (Towaga et Kaji, 1967).

Cette action lysante de *Botrytis cinerea* sur les structures cellulaires de la baie peut d'ailleurs avoir pour effet de solubiliser aussi des éléments de la cellule autres que les seuls éléments azotés.

Ainsi cet enrichissement des baies des raisins en activités protéolytiques comme d'ailleurs en activités polyphénoloxydasiques par *Botrytis cinerea* met l'accent sur le rôle fondamental joué par les agents infectieux sur la désorganisation des structures cellulaires et la composition des fruits avec les incidences que cela comporte sur leur conservation et leur transformation technologique.

Du point de vue fondamental, l'étude de la ou des enzyme(s) responsable(s) de ces activités protéolytiques, reste à faire. Nous avons seulement précisé que cet équipement protéolytique, isolé de son milieu naturel par précipitation acétonique, a, vis-à-vis de l'hémoglobine, un pH optimal voisin de 2,0 et une température optimale comprise entre 70 et 75°.

Cette résistance à la chaleur assez remarquable peut être due au fait que l'enzyme est liée à un protecteur ou qu'elle possède une structure particulière qui serait intéressante à préciser.

Du point de vue technologique quel peut être l'intérêt de la ou des protéase(s) mise(s) en évidence ?

Puisqu'on ne trouve aucune activité dans les vins non désalcoolisés, c'est essentiellement dans les phases de la vinification précédant la fermentation alcoolique, qu'elles peuvent intervenir : (*a*) quantitativement en favorisant l'extraction des protéines liées du grain comme cela a déjà été constaté sur d'autres matériels biologiques (Rothberg et Axilrod, 1967) et (*b*) qualitativement en dégradant, suivant leur spécificité, les diverses formes de constituants protéiques du milieu.

On conçoit dès lors toute l'importance qu'elles pourraient avoir sur le potentiel biotique des moûts, leur fermentescibilité, leur aptitude à la clarification, et la stabilité physicochimique des vins.

Cette intervention est possible puisqu'aux pH des moûts, compris entre 3,0 et 3,5, elles ont encore 40 à 60 p. 100 de leur activité au pH optimal (fig. 2) et elle sera d'autant plus rapide et poussée que le milieu sera plus riche en activités et que le traitement technologique du raisin sera effectué à une température plus voisine de leur température optimale d'action c'est-à-dire à 55°C.

Les meilleures possibilités d'action sont donc réalisées dans les techniques d'élaboration des jus de raisin ou des vins faisant intervenir la macération à chaud des vendanges saines et davantage encore des vendanges pourries.

Mais l'intervention des protéases n'est pas exclue non plus dans la technique de vinification par macération carbonique des baies où les longues durées d'action pourraient compenser en partie le niveau de température très éloigné de l'optimum.

Cette double action quantitative et qualitative reste toutefois à préciser, de même qu'il reste à préciser la part qui revient à l'extraction enzymatique et à l'extraction thermique dans l'enrichissement en azote que nous avons constaté dans les moûts de vendanges chauffées.

Pour l'instant nous avons simplement constaté que la solubilisation de l'azote

des poudres acétoniques de raisin en fonction de la température de macération passe par un optimum, ce qui pourrait bien être l'indice d'une extraction enzymatique.

L'effet activateur des faibles doses de SO_2 est aussi une observation intéressante dans ses applications technologiques.

Reçu pour publication en juillet 1968.

SUMMARY

THE PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF THE GRAPE

The authors of this note show that the grape is endowed with proteases, describe the techniques they have developed for measuring the activities and specify where they are located in the berry, their evolution during the grape's growth and during alcoholic fermentation, as well as some of their properties of technological interest.

RESUMEN

LAS ACTIVIDADES PROTEOLITICAS DE LA UVA

Los autores de este informe demuestran que la uva está dotada de proteasas y proceden a la descripción de las técnicas de medidas de las actividades que han registrado y, asimismo, precisan su localización en el fruto, su evolución durante el transcurso del crecimiento del grano y de la fermentación alcohólica, así como ciertas de sus propiedades de interés tecnológico.

RASSIUNTO

LE ATTIVITA PROTEOLITICHE DELL'UVA

Gli Autori di questa memoria mostrano che l'uva è dotata di proteasi, dezcrivono le tecniche delle misure delle attitvità che hanno messo al punto e precisano la loro localizzazione nella bacca, la loro evoluzione nel corso dello sviluppo del grano e della fermentazione alcoolica come pure delle loro propietà d'interesse tecnologico.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdo K. M., King K. W., 1967. Enzymatic modification of extractibility of proteins from Soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, **15**, (1), 83-87.

Anson M. L., 1938. *J. gen. Physiol.*, **22**, 79.

Baglioni S., Casale L., Tarantola C., 1937. L'attivita proteolitica del succo d'uva. *Problema alimentare*, **15**, (1), 1-17.

Chandrasckaran A., King K. M., 1967. Enzymatic modification of the extractibility of proteins from coconuts. *J. Agric. Food Chem.*, **15**, (2), 305-309.

Deverall B. J., 1961. Phenolase and pectic enzyme activity in the chocolate spot disease of beans. *Nature*, **28**, 311.

Dion W. M., 1950. The proteolytic enzymes of microorganisms I. Survey of fungi and actinomycete for proteases production in submerged culture. *Canad. J. Res.*, **28**, (6), 577-585.

HANCOCK F. G., MILLAR R. M., 1965. Association of cellulolytic, proteolytic and xylolytic enzymes with southern anthracnose, spring black stem and stemphyllium leaf spot of alfalfa. *Phytopathology*, **55**, 356-360.

MARTEAU G., 1967. Les enzymes pectolytiques et la technologie du raisin et de la pomme. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, B 223-245.

MOORE S., STEIN W. H., 1948. *J. biol. Chem.*, **176**, 367.

MOORE S., STEIN W. H., 1954. *J. biol. Chem.*, **211**, 907.

NASON A., 1955. *Methods in enzymology*, vol. I, p. 63, Academic Press inc., publishers New York.

PANTANELLI, 1911. Cité par J. RIBÉREAU-GAYON in *Bull. Off. internation. Vigne Vin*, 1943, **16**, (160), 51.

PEYNAUD E., MAURIÉ A., 1953. Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du grain au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 15.

PORTER F. M., 1966. Protease activity in deseased fruits. *Phytopathology*, **56**, 1424-1425.

POUX C., 1967. Enzymes oxydatifs dans le raisin. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, B 205-222.

ROTHBERG S., AXILROD G. D., 1967. Enzymatic solubilization of insoluble proteins at neutral pH. *Science*, **156**, 90-93.

SAULNIER-BLACHE P., 1963. Étude du développement du raisin. I. Croissance, accumulation des protéines et respiration pendant le passage de la phase végétative à la maturation. *Ann. Physiol.*, **5**, (3), 217-228.

TAWAGA K., KAJI A., 1967. Production of pectic enzymes using botrytis cinerea and observations plant tissue maceration. *J. ferm. Technol.*, **45**, (4), 347.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 207-215.

FERMENTATION DU MOÛT DE RAISIN EN CONTINU. FORMATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS

M. FLANZY*, C. POUX*, P. DUBOIS**, P. DUPUY**

**Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne*
***Station de Technologie des Produits végétaux,*
Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, 21-Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La fermentation du moût de raisin en continu dans des appareils de laboratoire a été reprise lors de la vendange 1966. En se plaçant à deux températures différentes on a étudié les populations de levures et de bactéries, la vitesse de fermentation et la production d'alcools supérieurs.

INTRODUCTION

Les essais déjà effectués (Flanzy et *al.*, 1966) avaient permis de préciser les modalités d'emploi de l'anhydride sulfureux en vue d'arrêter, dans un appareil en marche, le développement des germes responsables de la piqûre lactique. On avait alors constaté qu'une élévation de la température gênait le développement des bactéries lactiques. Pour confirmer ces résultats, deux essais ont été réalisés, l'un à 25°C, l'autre à 35°C.

On a, en outre, cherché à savoir si les vins provenant de fermentation continue avaient les mêmes teneurs en alcools supérieurs que les vins élaborés en cuves séparées. En effet, selon les expériences de Hough et Stevens (1961), les bières fermentées en continu seraient plus riches en alcools supérieurs, tels qu'isobutanol et isopentanols, que ne le sont les bières obtenues par le procédé discontinu. Étant donné les rôles organoleptique et toxicologique de ces alcools, leur analyse constitue un des moyens d'appréciation de la qualité des vins obtenus, et par voie de conséquence, un moyen d'appréciation des possibilités de la méthode d'élaboration.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE ET MATÉRIEL UTILISÉ

Pour cette expérimentation, on a utilisé deux appareils de 2,5 l semblables à celui décrit précédemment (FLANZY et *al.*, 1966). Ces appareils sont placés dans une pièce à température régulée à 25°C, et l'un d'eux est entouré d'un tube de caoutchouc demi-cylindrique où circule de l'eau thermostatée à 35°C. Le moût servant à l'expérimentation est obtenu tous les deux ou trois jours par pressurage de raisins de *Carignan* (*Vitis vinifera*) conservés en frigorifique. Le lot de raisin n'a pas toujours fourni des moûts de même densité. Le tableau I indique les densités et les acidités totales des moûts ayant servi à alimenter les appareils.

Au début de l'expérience, 5,5 l de moût de densité 1,085 sont ensemencés avec une souche de levures sélectionnée à 1,5. 10^6 cellules par ml et sont placés à la température de 25°C. Les deux appareils sont remplis progressivement, le lendemain, avec le levain ayant atteint la densité de 1,049, et placés l'un à 25°C, l'autre à 35°C.

L'apport quotidien du moût sulfité à 50 mg/l d'anhydride sulfureux débute le jour suivant. La densité est alors de 1,027 dans l'appareil maintenu à 25°C et de 1,020 dans celui qui est maintenu à 35°C. Le moût est introduit journellement durant un temps variant de 8 à 9 heures avec un débit de 100 à 110 ml/h.

La mesure de la densité a lieu le matin avant la mise en route du pompage au niveau de la tubulure située aux deux tiers de la hauteur de la masse du moût, et le soir sur les 100 derniers ml de vin qui s'écoulent. Les levures sont comptées au prélèvement du matin.

TABLEAU I

Composition des moûts ayant servi à alimenter les appareils de fermentation continue

Dates	Densité à 15°C	Acidité totale	pH	Dates	Densité à 15°C	Acidité totale
28-9	1,085	4,9	3,35	17-10	1,090	4,35
1-10	1,089	—		20-10	1,092	4,00
4-10	1,090	—		22-10	1,080	4,5
6-10	1,080	—		24-10	1,090	4,65
14-10	1,089	—		26-10	1,090	4,7

Des déterminations chimiques, suivant les méthodes indiquées par JAULMES (1951), ont été faites chaque jour sur le moût fermenté sortant de l'appareil. L'acidité volatile a été dosée par acidimétrie après entraînement à la vapeur d'eau, l'acétaldéhyde par la méthode JAULMES-ESPEZEL, l'acide sulfureux libre et combiné par la méthode de RIPPER. Les levures ont été comptées avec un compte-globules. L'examen microscopique en contraste de phase et avec objectif à immersion a permis de déterminer la proportion des bactéries par rapport aux levures. L'acide malique par chromatographie sur papier et la méthode PEYNAUD (1938), l'acide lactique par la méthode PEYNAUD et CHARPENTIER (1950).

L'analyse des alcools supérieurs a été faite par chromatographie en phase gazeuse, après extraction à l'éther diéthylique, selon une technique nouvelle inspirée des travaux de SINGLETON (1961). L'aspect théorique de ce mode d'extraction est à l'étude, et on n'indiquera ici que le protocole utilisé. L'expérience a montré qu'il permettait d'obtenir très rapidement des résultats reproductibles et comparatifs, à condition que les degrés alcooliques des vins soient peu différents.

Dans une fiole jaugée de 100 ml à bouchage émeri, on a introduit successivement 60 g de phosphate monosodique sec, 70 ml de vin et 1,5 ml d'éther diéthylique. On bouche et on agite. On porte au bain-marie à 25°C, et on agite fréquemment pour assurer la solubilisation du sel. Après 30 minutes une agitation permet normalement d'obtenir un liquide clair et un léger excès de sel non dissous. Ce liquide ne tarde pas à se séparer en deux phases, dont l'une, organique, vient surnager dans le col du

flacon. On laisse ce relargage s'effectuer pendant une nouvelle période de 30 minutes toujours au bain-marie à 25°.

On pipette alors 0,5 ml de phase organique, que l'on introduit dans un petit tube contenant 0,2 g de chlorure de sodium et 0,5 ml d'eau. On bouche et on agite. Deux phases se séparent très rapidement. La phase organique qui surnage est essentiellement constituée par de l'éther diéthylique, de l'éthanol et la majeure partie des substances volatiles du vin. On injecte 2 µl de cette phase organique dans l'appareil d'analyse. C'est dans la mesure de ces 2 µl que réside l'erreur la plus importante. On a utilisé le chromatographe en phase gazeuse modèle Aerograph Hy-Fi 600, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne a une longueur de 10 pieds (3,2 m) et un diamètre de 1/8 de pouce (3,2 mm). Elle est remplie de Chromosorb W 60-80 mesh imprégné à 10 p. 100 de succinate de diéthylène glycol. Le débit d'azote, utilisé comme gaz vecteur, est de 35 ml/minute. La température de la colonne est programmée de 45 à 145°C (8°C/minute) dès que l'injection est faite, puis elle est laissée à 145°C jusqu'à ce que l'alcool phényléthylique soit élué. Ce mode opératoire a été retenu car il a permis non seulement la recherche de l'isobutanol et des isopentanols, mais aussi celle de l'hexanol, du phényléthanol et du lactate d'éthyle. On entend par isopentanols la somme des alcools isoamyliques actif et inactif qui ne sont pas séparés avec la phase liquide utilisée dans la colonne. Les surfaces des pics obtenus sur les chromatogrammes ont été mesurées par triangulation et multipliées par les facteurs d'atténuation de la réponse du détecteur.

RÉSULTATS

Les résultats des comptages et des diverses analyses faites en cours de fonctionnement des fermenteurs sont indiqués dans le tableau 2 et ceux qui concernent les analyses des vins finis sont indiqués dans le tableau 3.

On constate que le nombre de levures baisse au cours du fonctionnement et se stabilise à partir du 17 octobre à des valeurs comprises entre 25 et 40. 10^6 cellules/ml à 25°C, et entre 35 et 55. 10^6 cellules/ml à 35°C. (tabl. 2).

Les vins contiennent, après achèvement de la fermentation, une quantité d'acide lactique inférieure ou supérieure à la quantité retrouvée dans le vin témoin de vinification classique en rosé qui a effectué sa fermentation malolactique (tabl. 3). Le moût de départ contenait 75 méq. d'acide malique par litre. L'élévation d'acide lactique qui apparaît nettement sur les vins obtenus en fin de fonctionnement des appareils est à mettre en parallèle avec l'augmentation du nombre des bactéries lactiques (tabl. 2). Ce surplus apparaît plus tôt dans l'appareil maintenu à 25°C que dans celui qui est maintenu à 35°C, et il en va de même pour les bactéries lactiques.

On peut aussi constater que les quantités de sucre fermenté dans l'appareil sont plus importantes à 25°C qu'à 35°C, bien qu'on compte légèrement plus de levures à 35°C qu'à 25° (tabl. 4).

Les alcools supérieurs ont été dosés sur les vins issus des appareils après achèvement de la fermentation alcoolique. La figure 1 indique pour des vins issus de la même date des appareils à 25°C et 35°C, les teneurs en isobutanol, isopentanols et phényléthanol en pour cent par rapport à un vin témoin obtenu par fermentation discontinue du même moût à 25°C. On a rapporté sur cette figure les variations de la teneur en levures présentes au moment où le vin sortait des appareils. On constate que la production de ces trois alcools diminue, au cours du fonctionnement des appareils en même temps que le nombre de levures. On observe aussi que les teneurs en alcools supérieurs obtenues en fin de fonctionnement des appareils, c'est-à-dire lorsque le processus est vraiment continu, sont plus élevées pour les vins obtenus à 35°C que

TABLEAU 2

Analyses faites en cours de fonctionnement des appareils

Dates	25°C						35°C					
	Densité à 15°C		Acidités		Levures (10^6/ml)	Bactéries (10^6/ml)	Densité à 15°C		Acidités		Levures (10^6/ml)	Bactéries (10^6/ml)
	Matin	Soir	Totale	Volatile			Matin	Soir	Totale	Volatile		
1-10	1,027	1,028	5,80	0,26	148		1,020	1,026	5,90		144	
2-10	1,024	1,031						1,030				
3-10	1,021	1,027	5,40		131		1,021	1,029	5,55		101	
4-10	1,020	1,018	5,30		132		1,025	1,022	5,50	0,10	94	
5-10	1,018	1,021	5,05		111		1,019	1,028	5,35	0,10	76	
6-10	1,023	1,025	4,90		95		1,026	1,033	5,15	0,12	81	
7-10	1,020	1,025			82		1,030	1,035				
8-10	1,016	1,022					1,028	1,034				
9-10	1,009	1,017					1,024	1,033				
10-10	1,002	1,010	5,00	0,13	76		1,022	1,025	5,60	0,18	65	
11-10	0,999	1,009	4,80	0,18	70		1,021	1,028	5,40	0,20	102	
12-10	0,999	1,021	4,70	0,18	53		1,021	1,028	5,10	0,21	87	
13-10	0,998	1,010	5,00	0,22	60		1,023	1,032	4,80	0,19	75	
14-10	0,998	1,011	4,60	0,21	51		1,023	1,030	4,80	0,16	66	
15-10	0,998	1,015	4,80	0,19	43		1,025	1,034	4,90	0,18	69	
16-10	0,999	1,010			45		1,021	1,033			47	
17-10	0,995	1,010	4,30	0,34	37	10	1,019	1,032	4,00	0,17	45	
18-10	0,995	1,010	3,80	0,24	39	15	1,021	1,031	3,20	0,15	50	
19-10	0,995	1,011	3,85	0,28	36	19	1,021	1,032	3,30	0,18	40	
20-10	0,995	1,010	3,60	0,30	31	30	1,019	1,032	3,10	0,15	37	
21-10	0,995	1,011	3,70	0,32	34	27	1,019	1,032	2,90	0,16	40	
22-10	0,998	1,011	3,70	0,37	28	49	1,020	1,032	3,05	0,18	40	
23-10	1,000	1,005	3,20	0,45	28		1,022	1,030	2,60	0,18	36	
24-10	0,996	1,008	3,80	0,45	23	44	1,020	1,029	3,50	0,21	36	2
25-10	0,996	1,011	4,00	0,45	24	58	1,018	1,031	4,00	0,22	38	8
26-10	0,996	1,013	4,10	0,48	27	46	1,018	1,032	4,00	0,23	51	8
27-10	0,998	1,012	3,90	0,50	31	54	1,020	1,033	3,60	0,28	52	8
28-10	0,997	1,012	3,90	0,57	32	92	1,017	1,031	3,60	0,30	54	12
29-10	0,998	1,004	4,00	0,40	30	36	1,019	1,026	3,30	0,39	48	24
30-10	0,997	1,004	3,80	0,69	26	46	1,017	1,028	3,10	0,41	46	49
2-11	0,994		4,10	0,77	5	44	0,998		3,70	0,38	12	30

TABLEAU 3

Analyses des vins obtenus par fermentation continue

	Vinification 25°C						Vinification 35°C				
	Témoin vinification classique	1-10	8-10	17-10	24-10	2-11	1-10	8-10	17-10	24-10	2-11
Alcool en degrés GL ...	12°5	11°5	12°7	12°65	12°3	12°35	11°55	12°65	12°70	12°50	12°45
pH	3,60	3,45	3,50	3,50	3,52	3,48	3,45	3,48	3,60	3,62	3,55
Acidité totale (+).....	3,20	3,80	3,20	3,30	3,50	4,10	3,60	3,20	2,70	2,70	3,50
Acidité volatile (+).....	0,30	0,20	0,27	0,38	0,66	0,80	0,27	0,29	0,34	0,39	0,54
Acidité fixe (+).....	2,90	3,60	2,93	2,92	2,84	2,90	3,33	2,91	2,36	2,31	2,96
Acide lactique méq/l ...	30	28	21	27	35	41	28	26	20	22	36
Acide malique (absent) .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anhydride sulfureux mg/l											
libre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
combiné.....	6	6	18	19	18	16	0	13	13	11	12
Acétaldéhyde mg/l	82	62	31	48	28	26	48	20	28	25	24

(+) en g de SO_2H_2/l.

pour ceux fermentés à 25°C. Les variations de teneur en phényléthanol suivent presque exactement les variations de teneur en levures des vins à la sortie des appareils.

Les teneurs en hexanol diminuent lentement (fig. 2) et sont toujours très faibles par rapport à celles des autres alcools.

Les variations de teneur en lactate d'éthyle sont aussi représentées sur la figure 2. Les augmentations que l'on constate aussi bien à 25°C qu'à 35°C sont à mettre en relation avec les variations de teneur en acide lactique (tabl. 3).

TABLEAU 4

Sucre fermenté en grammes par litre et par jour

Date	Vinification 25°C	Vinification 35°C
1 octobre 66	52,7	45,1
2 —	60,1	60,3
3 —	53,6	42,3
4 —	48,0	52,6
5 —	54,0	47,0
6 —	60,4	43,3
7 —	61,9	49,7
8 —	75,6	58,5
9 —	76,7	55,1
10 —	73,2	53,4
11 —	70,1	54,1
12 —	68,6	47,1
13 —	76,4	56,9
14 —	76,4	51,7
15 —	76,4	64,0
16 —	75,6	61,6
17 —	77,9	56,5
18 —	76,4	59,1
19 —	72,5	59,7
20 —	69,4	53,8
21 —	69,4	52,6
22 —	72,5	54,7
23 —	56,9	45,1
24 —	76,4	52,4
25 —	72,5	54,3
26 —	81,8	68,7
27 —	75,6	63,4
28 —	85,0	64,1
29 —	85,7	73,2
30 —	76,4	
Moyenne générale.....	70,2	55,1
Moyenne entre le 17 et le 30	74,9	58,3

La teneur en sucre du moût en fermentation a été déduite de la densité en utilisant une abaque expérimentale.

Calcul du sucre fermenté en 24 h = A + B — C — D.

A = sucre présent le matin
B = sucre introduit dans la journée
C = sucre sorti avec le moût fermenté
D = sucre restant le lendemain matin

% du témoin

% du témoin

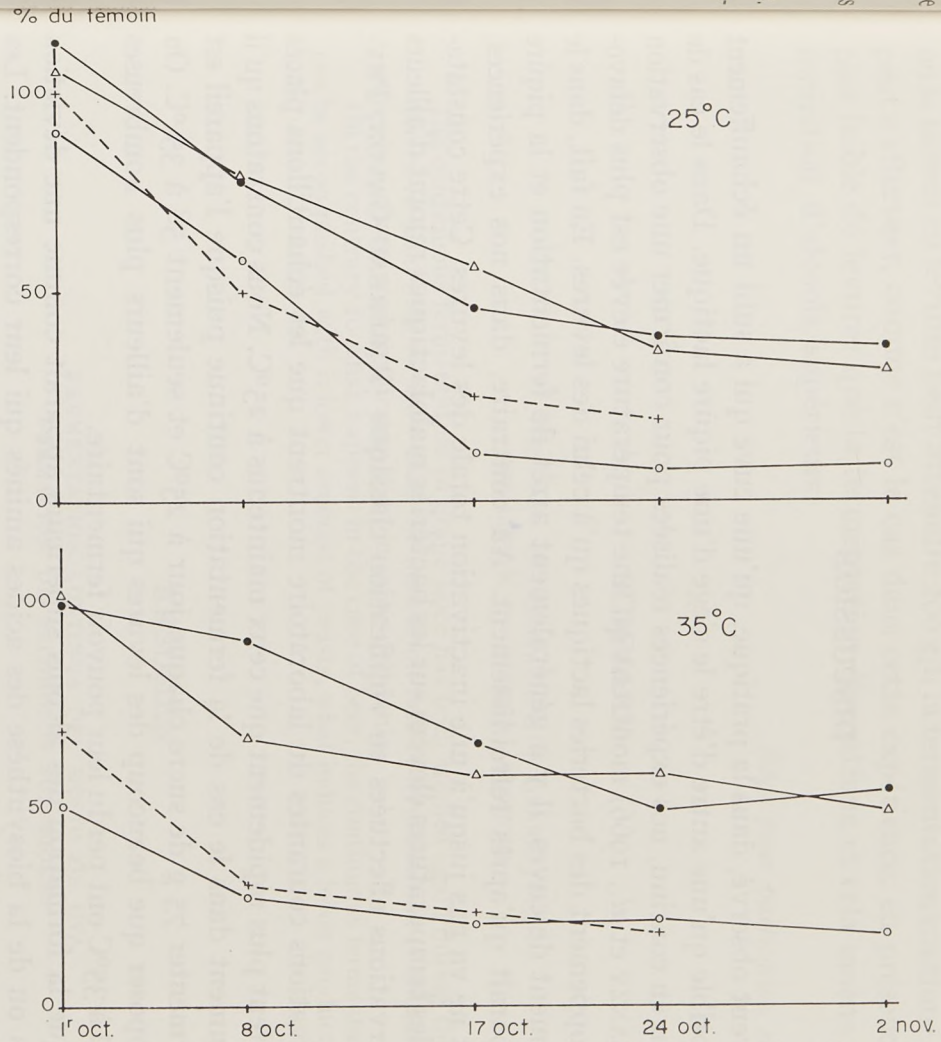


FIG. 1. — *Variation des teneurs en alcools supérieurs des 5 vins obtenus au cours de la marche des fermenteurs*

Les résultats sont exprimés pour l'isobutanol (●) les isopentanols (△) et le phényléthanol (○) en pour cent des teneurs correspondantes d'un échantillon témoin obtenu par fermentation discontinue à 25°C. Les dosages sont effectués sur des vins entièrement fermentés provenant du fonctionnement de deux fermenteurs l'un à 25°C, l'autre à 35°C. Les teneurs en levures (- - - + - - -) des produits sortant du fermenteur sont aussi exprimées en pour cent du même échantillon témoin.

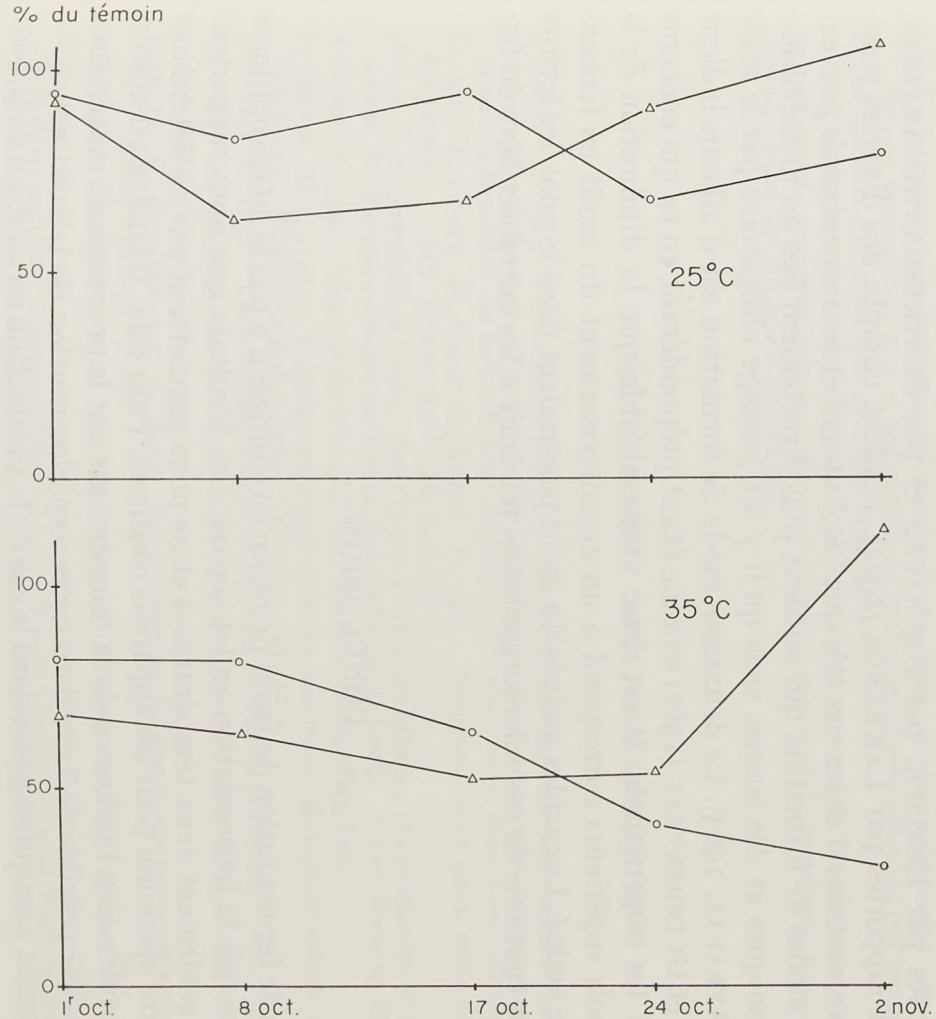


FIG. 2. — *Variation des teneurs en hexanol et lactate d'éthyle de 5 vins obtenus au cours de la marche des fermenteurs*

Les résultats sont exprimés pour l'hexanol (○) et pour le lactate d'éthyle (△) en pour cent des teneurs correspondantes d'un échantillon témoin obtenu par fermentation discontinue à 25°. Les dosages sont effectués sur des vins entièrement fermentés provenant du fonctionnement de deux fermenteurs l'un à 25°C l'autre à 35°C.

DISCUSSION

On a souvent observé, dans la pratique, qu'une cuve qui a subi un échauffement est plus susceptible qu'une autre d'être le siège d'une piqûre lactique. Dans le cas de la fermentation en continu, nos expériences réalisées pour confirmer une observation antérieure (FLANZY et *al.*, 1966) montrent qu'une température élevée est plus défavorable au développement des bactéries lactiques qu'à celui des levures. En fait, dans le cas d'échauffement de cuves, il y a généralement arrêt de fermentation et la piqûre lactique n'apparaît qu'après refroidissement. Au contraire, dans nos expériences, l'échauffement ne va pas jusqu'à une inactivation totale des levures. Cette constatation de l'effet des températures élevées sur les bactéries malolactiques rejoint d'ailleurs certaines observations effectuées en vinification classique (RIBÉREAU-GAYON, PEYNAUD, 1961).

Les observations courantes du laboratoire montrent que les échantillons placés à 35°C fermentent plus rapidement que ceux maintenus à 25°C. Nous constatons qu'il en va différemment dans le cas de la fermentation continue puisque l'appareil est capable de fermenter 75 g de sucre chaque jour à 25°C et seulement 58 à 35 °C. On peut donc supposer que beaucoup des levures qui sont d'ailleurs plus nombreuses dans l'appareil à 35°C ont perdu leur pouvoir fermentaire.

On sait que la formation des alcools supérieurs apparaît comme une déviation de l'utilisation ou de la biosynthèse des acides aminés qui leur correspondent. Les schémas proposés par EHRLICH, par NEUBAUER et par SENTHESHANMUGANATHAN tels qu'ils sont rapportés par LAWRENCE (1964), rendent compte des diverses possibilités. En outre, certains d'entre eux tels que l'isobutanol et les isopentanols peuvent avoir d'autres modes de formation qui seraient plus directement liés au métabolisme des acides cétoniques et des sucres, sans qu'il y ait passage obligatoire par le stade acide aminé (AYRAPAA, 1963). Ce deuxième mode de formation est d'ailleurs indiqué par PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) comme étant prépondérant en ce qui concerne l'isobutanol et les isopentanols. Il est donc vraisemblable que la diminution de la teneur en alcools supérieurs correspond à un appauvrissement du moût en fermentation en azote aminé. Les acides aminés du moût passeraient dans le pool des levures et l'élimination continue de ces microorganismes tendrait à les entraîner hors du fermenteur.

CONCLUSION

La vitesse de fermentation du moût de raisin en continu n'a pas le même optimum de température que la fermentation en lot séparé. Les résultats que nous rapportons ici concernent seulement deux températures et ne nous permettent pas de déterminer une température optimum pour les appareils continus. Pour cela, il faudrait d'ailleurs prendre en considération l'influence de la température sur le processus de macération ce qu'il n'a pas été possible de faire dans cette expérimentation de laboratoire.

Contrairement à ce qui se passe dans le cas de la production en continu de la bière

où la teneur en levures peut atteindre 200 g/l, la fermentation continue du jus de raisin peut s'effectuer, comme c'est le cas dans cette expérience, en présence d'un nombre plus faible de levures que la fermentation discontinue et cela amène une plus faible formation d'alcools supérieurs.

Reçu pour publication en mars 1967.

SUMMARY

CONTINUOUS FERMENTATION OF GRAPE JUICE.
FORMATION OF HIGHER ALCOHOLS

The continuous fermentation of grape juice has been studied again during the vintage 1966.

We have been able to show that the maximum rate of fermentation is obtained at lower temperatures in a continuous apparatus than in separated tanks.

On the contrary to what happens in the case of beer, the continuous fermentation of grape must can be accomplished with a lower amount of yeasts, what induces a lower production of higher alcohols.

RESUMEN

FERMENTATION CONTINUA DEL MOSTO DE UVA
FORMACION DE ALCOHOLOS SUPERIORES

La fermentaction continua del mosto de uva esta estudiada de nuevo por la cosecha 1966.

Hemos demostrado que el maximum de rendimiento esta obtenido por temperaturas mas bajos con el aparato continuo que in cubas separadas.

Al contrario de lo que se passa in el case de la cerveza, la fermentacion continua del mosto de uva puede ser cumplida con una mas pequena cantitad de levaduras, lo que induce mas bajo producimiento de alcoholos superiores.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AYRAPAA T., 1963. Formation of phenethyl alcohol during alcoholic fermentation compared with formation of aliphatic fusel oils. (Formation d'alcool phényléthylique au cours de la fermentation alcoolique comparée à la formation des huiles de fusel aliphatiques). *Proc. europ. Brew. Conv.* (Bruxelles), 276-287.

FLANZY M., DUPUY P., POUX C., ANDRÉ P., 1966. Fermentation du jus de raisin en continu. Études de laboratoire. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 3, 311-320.

HOUGH J. S., STEVENS R., 1961. Beer flavor. IV. Factors affecting the production of fusel oil (Flaveur de la bière. IV. Facteurs influant sur la formation de l'huile de fusel). *J. Inst. Brewing*, **67**, 488-493.

JAULMES P., 1951. *Analyse des Vins*, Librairie Poulain, Montpellier, France.

LAWRENCE W. C., 1964. Volatile compounds affecting beer flavor. (Composés volatils influant sur la flaveur de la bière). *Wallerstein Lab. Comm.* 27, nº 93/94, 123-152 A.

PEYNAUD E., 1938. L'acide malique dans les moûts et les vins de Bordeaux. *Ann. Falsif. Fraudes*, 332.

PEYNAUD E., CHARPENTIER Y., 1950. Note pour le dosage de l'acide lactique dans les boissons fermentées. *Ann. Falsif. Fraudes*, 246.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification. *Ann. Technol. agric.*, 2, 85-105.

RIBÉREAU-GAYON J, PEYNAUD E., 1961. *Traité d'Œnologie*, tome 2, p. 449-490.

SINGLETON V. L., 1961. An extraction technique for recovery of flavors, pigments and other constituents from wines and other aqueous solutions. (Une technique d'extraction pour l'isolement des arômes, des pigments et des autres constituants des vins et d'autres solutions aqueuses). *Amer. J. Oenol., Vitic.*, **12**, (1), 1-8.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 217-225.

LES PROTÉINES SOLUBLES DU BLÉ

I. — ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES ALBUMINES ET DES GLOBULINES

P. FEILLET, A. BOURDET

avec la collaboration technique de Danièle BERGER, Ginette GOBIN et Francine GUILLEMOT

Laboratoire d'Études et de Contrôle de la Qualité des Blés français,
16 rue Nicolas Fortin, 75 - Paris (13e)
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

On décrit une méthode d'isolement des albumines et des globulines de la farine de blé. L'étude physico-chimique des préparations obtenues vérifie les vues d'OSBORNE sur les caractéristiques de solubilité de ces deux groupes protéiques, précise leur hétérogénéité électrophorétique à pH = 8,9 et pH = 3,2, et confirme la présence de phosphore dans les globulines ainsi que son absence dans les albumines.

INTRODUCTION

Depuis les travaux d'OSBORNE (1907), et faute d'autre critère physico-chimique plus précis, les protéines solubles du blé demeurent classiquement divisées en deux grands groupes : les Albumines, solubles dans l'eau et les solutions salines, et les Globulines, solubles en milieu salin neutre mais insolubles dans l'eau. Chacun de ces groupes représente un matériel extrêmement complexe et encore très mal connu (FEILLET, 1967 *a*) ; les globulines, notamment, n'ont été que très peu étudiées en raison, sans doute, de la grande difficulté de leur remise en solution après isolement.

Cependant, et en plus de l'intérêt évident que leur étude comporte pour la biochimie des protéines en général, la physiologie végétale et la génétique, il est certain qu'une meilleure connaissance de ce matériel doit contribuer à mieux « maîtriser » les différentes étapes de la transformation de la farine en ses produits finis (FEILLET, 1967 *b*).

Ces raisons nous ont conduit à entreprendre une étude approfondie des protéines solubles du blé.

Première étape de ce travail, le présent mémoire rend compte des conditions d'isolement, de certaines caractéristiques physicochimiques et de l'hétérogénéité des Albumines et des Globulines. Par souci de simplification, nous nous sommes limités aux protéines de la farine, dont la nature est probablement différente de celle des sons et du germe ; nous avons également négligé, *a priori*, tout aspect quantitatif.

MATÉRIEL D'ÉTUDE ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1. *Matériel d'étude*

Le travail expérimental a été réalisé sur une farine extraite d'un même lot de blé *Capelle*, par mouture sur moulin Buhler (taux d'extraction : 70-72 p. 100). Déterminées suivant le protocole décrit par FEILLET (1965), les compositions protéiques du blé et de la farine sont respectivement les suivantes (en g p. 100 g s. s.) : N_T : 1,910 et 2,170 ; azote non protéique : 0,148 et 0,235 ; protéines totales : 10,05 et 11,04 ; protéines solubles : 1,14 et 1,35 ; gliadines : 5,76 et 5,22 ; gluténine : 3,15 et 4,47.

2. *Méthodes expérimentales*

a) *Isolement des protéines.*

Les protéines sont isolées de la manière suivante (tabl. 1) : 1 kg de farine est mis en suspension dans 6 litres de solution saline (0,5 M NaCl — amené à pH = 6,8 par du phosphate disodique) ; après une heure de contact à 4°, on sépare la fraction soluble du culot résiduel par centrifugation (3 000 *g*, 15 minutes). Différents traitements peuvent être alors entrepris :

— l'extrait salin est dialysé puis lyophilisé : on isole ainsi les *protéines solubles dans les sels* (P. S. S.) ;

— l'extrait salin est dialysé puis centrifugé ; on lyophilise alors séparément le surnageant et le précipité (lavé auparavant par 2 × 100 ml H_2O) ; on isole ainsi les *Protéines solubles dans l'eau* (P. S. E.) et les *protéines insolubles dans l'eau* (P. I. E.) ;

— l'extrait salin est amené à une concentration 2 M en sulfate d'ammonium. Après un repos d'une nuit à 4°, le précipité isolé par centrifugation est repris par 1 000 ml d'eau désionisée, l'insoluble (1) est éliminé et la fraction soluble dialysée. Après centrifugation de ce dernier extrait, on lyophilise séparément le surnageant et le précipité qui représentent respectivement les Albumines A (ALB. A) et les Globulines A (GLOB. A) ;

— un traitement identique du surnageant précédent amené à $(NH_4)_2SO_4$ 4 M permet d'isoler les Albumines B (ALB. B) et les Globulines B (GLOB. B).

On obtient donc finalement 7 préparations protéiques (2) :

les Protéines solubles dans les sels	P. S. S.
les Protéines solubles dans l'eau	P. S. E.
les Protéines insolubles dans l'eau	P. I. E.
les Albumines 0-2 M $(NH_4)_2SO_4$	ALB. A
les Albumines 2 M-4 M $(NH_4)_2SO_4$	ALB. B
les Globulines 0-2 M $(NH_4)_2SO_4$	GLOB. A
les Globulines 2 M-4 M $(NH_4)_2SO_4$	GLOB. B.

b) *Autres techniques analytiques.*

La concentration en protéine est déterminée par micro-KJELDAHL sur les préparations lyophilisées ; Le phosphore est dosé suivant la microméthode colorimétrique de BRIGGS (1922) adaptée par MACHEBŒUF et DELSAL (1943) ;

(1) L'électrophorèse en gel d'amidon met en évidence la richesse en gliadine de cette fraction.

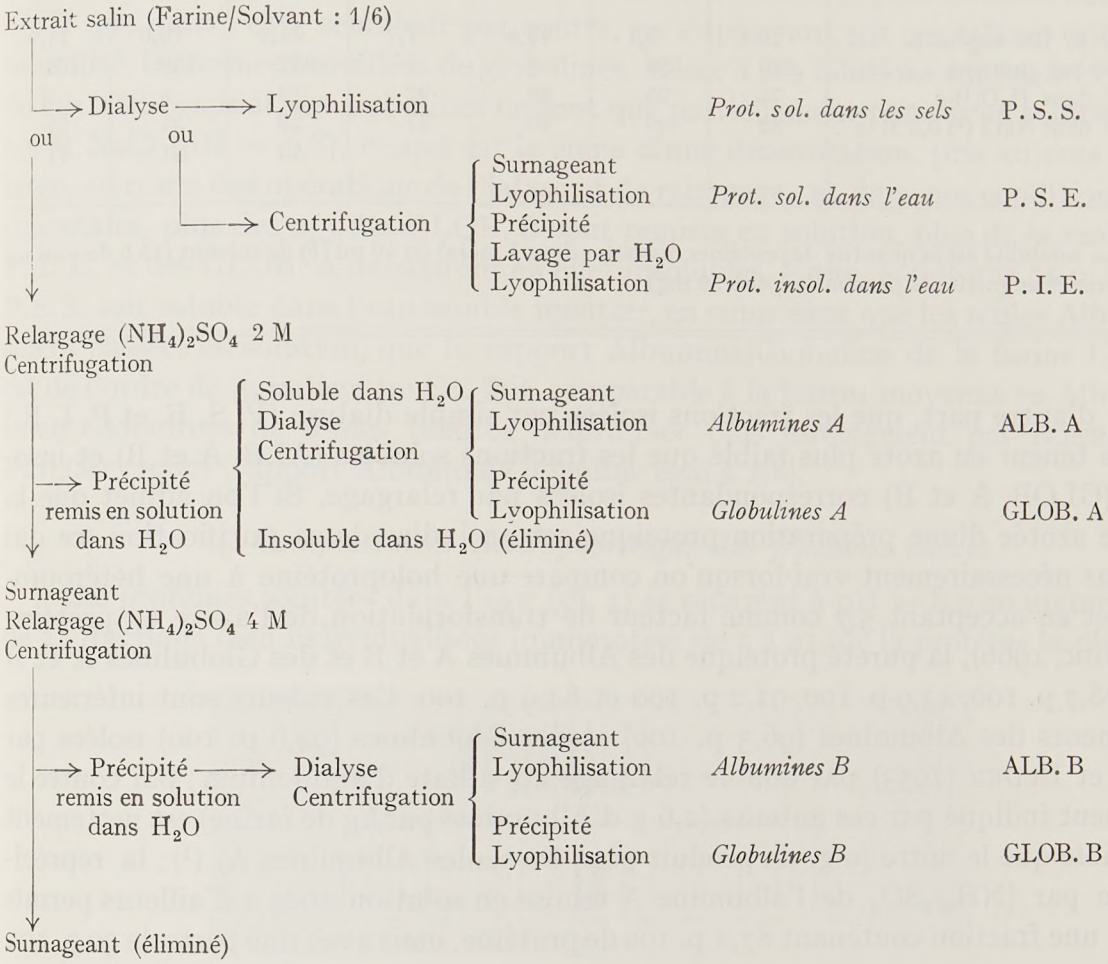
(2) Par suite de l'absence de définition suffisamment précise, chaque auteur a été conduit à utiliser sa propre terminologie ; nous n'avons évidemment pas pu échapper à cette règle.

La dialyse est faite au froid dans des tubes de viscose, deux jours contre l'eau courante et deux jours contre l'eau distillée, en présence de cristaux de thymol ;

L'électrophorèse en gel d'amidon est réalisée à pH = 3,2 (tampon lactate) ou à pH = 8,9 (tampon *TRIS*) dans les conditions déjà décrites (FEILLET, 1965).

TABLEAU I

Conditions d'isolement des protéines solubles du blé



RÉSULTATS

Les 7 préparations isolées (P. S. S., P. S. E., ALB. A, ALB. B, P. I. E., GLOB. A., GLOB. B), ont été caractérisées par leur teneur en azote et en phosphore, leur solubilité dans l'eau et dans les sels, et leur comportement électrophorétique.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2 et sur la planche 1.

DISCUSSION

1. *Teneur en azote*

On constate :

— d'une part, que les fractions insolubles (P. I. E., GLOB. A et B) et le sfractions isolées par relargage (ALB. A et B, GLOB. A et B) ont une teneur en azote plus élevée que les fractions solubles (P. S. E., ALB. A et B) ;

TABLEAU 2

Caractéristiques physico-chimiques des préparations protéiques isolées

Caractéristiques ↓ — Préparations →	P. S. S.	P. S. E.	ALB. A	ALB. B	P. I. E.	GLOB. A	GLOB.
Azote mg p. 100 mg m. s.	10,1	9,1	13,8	7,7	14,0	16,0	14,9
Pγ p. 100 mg protéine	310	50	8	7	842	550	475
Solubilité dans H_2O(1)-*a*	74	95	98	92	3	6	5
Solubilité dans NaCl (1) 0,5 M -*a* .	82	99	99	97	29	34	64
-*b* .	—	—	—	—	43	41	71

(1) La solubilité est la quantité de protéines dissoutes dans 5 ml (*a*) ou 40 ml (*b*) de solvant (15 h de contact à 4°), exprimée en p. 100 de protéines, (prise 50 mg).

— d'autre part, que les fractions isolées par simple dialyse (P. S. E. et P. I. E. ont une teneur en azote plus faible que les fractions solubles (ALB. A et B) et insolubles (GLOB. A et B) correspondantes isolées par relargage. Si l'on admet que la richesse azotée d'une préparation protéique est un indice de sa purification (ce qui n'est pas nécessairement vrai lorsqu'on compare une holoprotéine à une hétéroprotéine), et en acceptant 5,7 comme facteur de transformation de l'azote en protéine (TKACHUK, 1966), la pureté protéique des Albumines A et B et des Globulines A et B est de 78,7 p. 100, 43,9 p. 100, 91,2 p. 100 et 84,9 p. 100. Ces valeurs sont inférieures aux teneurs des Albumines (96,3 p. 100) et des Globulines (94,6 p. 100) isolées par PENCE et ELDER (1953) par double relargage au sulfate d'ammonium ; par contre le rendement indiqué par ces auteurs (2,6 g d'Albumines par kg de farine) est nettement plus faible que le nôtre (9 g. de produit pour les seules Albumines A) (1) ; la reprécipitation par $(NH_4)_2SO_4$ de l'albumine A remise en solution nous a d'ailleurs permis d'isoler une fraction contenant 87,2 p. 100 de protéine, mais avec une perte de 30 p. 100 en poids.

2. *Teneur en phosphore*

La teneur en phosphore des préparations confirme les résultats de FEILLET (1965) et BOURDET et FEILLET (1967) suivant lesquels les protéines solubles dans l'eau contiennent beaucoup moins de phosphore que les protéines insolubles dans l'eau. La valeur trouvée pour ces dernières est néanmoins plus faible dans cette étude que dans les travaux cités plus haut, en raison peut-être de la nature différente du matériel de départ. Il est, de plus, important de noter que les P. I. E. sont plus riches en phosphore que les globulines A et B, ce qui semble montrer que le phosphore dosé dans les protéines insolubles dans l'eau n'est pas lié en totalité à la protéine, à moins qu'une partie de ce phosphore ne soit libéré par hydrolyse enzymatique au cours des opérations de purification. L'absence quasi totale de phosphore dans les Albumines est par ailleurs vérifiée.

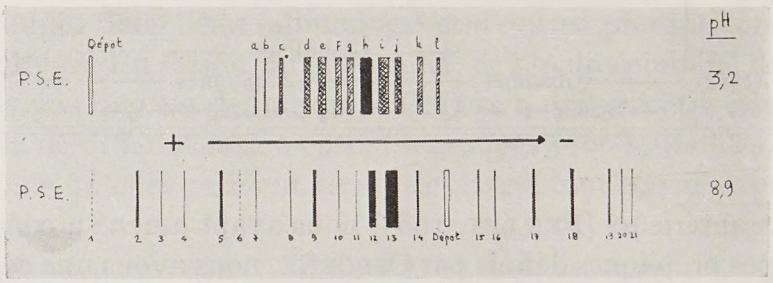
(1) Les rendements en globulines ne sont pas comparables, PENCE ayant extrait cette fraction à partir du germe.

3. *Caractéristiques de solubilité*

Les préparations de type « Albumine » sont en majeure partie solubles dans l'eau (à plus de 90 p. 100), alors que les « globulines » ne le sont pratiquement pas (de 3 à 6 p. 100 seulement) ; la fraction ALB. A répond le mieux à la définition des Albumines donnée par OSBORNE (1907) puisqu'elle est totalement soluble dans l'eau (98 p. 100) ; et dans les sels (99 p. 100) ; les fractions P. S. E. et ALB. B, plus solubles dans NaCl 0,5 M que dans l'eau, semblent par contre, en s'appuyant sur ces mêmes critères de solubilité, légèrement souillées de globulines. Même à des dilutions supérieures à celles de l'extrait original, les globulines ne sont que partiellement remises en solution dans 0,5 M NaCl (pH = 6,8), ce qui est le signe d'une dénaturation, pris au sens le plus large, au cours des opérations de dialyse et de relargage ; si, dans nos conditions expérimentales, plus des 2/3 des GLOB. B sont remises en solution, plus de la moitié des P. I. E. et des GLOB. A demeurent en effet insolubles. Enfin, le fait que 75 p. 100 des P.S.S. soit soluble dans l'eau semble montrer, en supposant que les seules Albumines soient passées en solution, que le rapport Albumine/Globuline de la farine *Cappelle* est de l'ordre de 3, valeur tout à fait comparable à la teneur moyenne en Albumines et en Globulines de 8 blés tendres déterminée plus directement par BOURDET et FEILLET (1967) (rapport Albumine/Globuline égal à 2,8).

4. *Comportement électrophorétique des fractions isolées*

Les protéines solubles dans l'eau (pl. 1) se séparent à pH = 8,9 en un minimum de 21 fractions bien individualisées (numérotées de 1 à 21, de la protéine la plus élec-



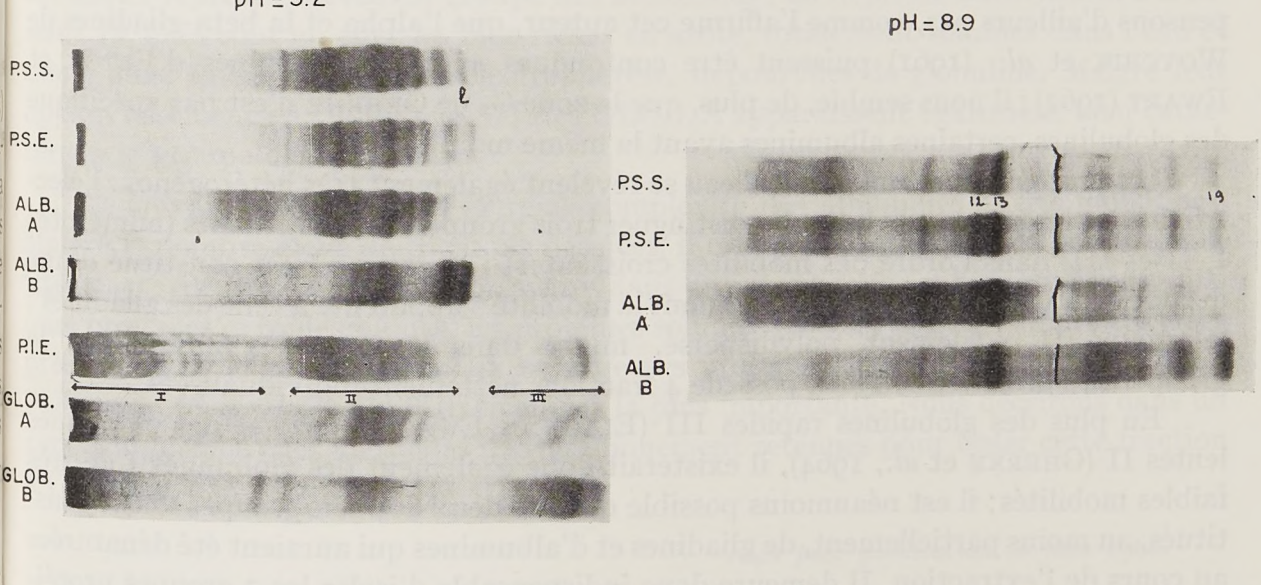


PLANCHE 1. — *Comportement électrophorétique des préparations protéiques isolées*

tronégative à la plus électropositive), mais en une douzaine de constituants seulement en milieu acide (identifiés par des lettres, de *a* à *l*, des fractions les plus lentes aux fractions les plus mobiles) ; le comportement dans ce tampon *Lactate* démontre par ailleurs l'absence de gliadine dans cette préparation (FEILLET, 1965).

Il est évidemment très difficile de relier ces deux nomenclatures, d'autant que certaines fractions différenciées en tampon *Tris* sont nécessairement confondues en tampon *Lactate*. Une correspondance avec les travaux antérieurs est également ardue ; une comparaison attentive des comportements électrophorétiques des fractions caractérisées par PENCE (1953), NIMMO et *al.* (1963) et GEHRKE et *al.* (1964) permet néanmoins de proposer, sous réserve, le tableau 3 suivant :

TABLEAU 3

Correspondance entre les nomenclatures utilisées par divers auteurs pour identifier les protéines solubles du blé en fonction de leur comportement électrophorétique.

Présent travail	Alb. 1-2 ..... 4-5-6 .... 8-9 14-		15 ..... 20-21.
PENCE (1953)	← $\alpha_{1, 2, 3, 4}$ →	← $\beta_{1, 2, 3, 4}$ →	← $\gamma_{1, 2, 3, 4}$ →
NIMMO et *al.* (1963)	←F_2.10→	← F_2.4 et 5 →	
MIKOLA (1965)			← Prot. basiques →
Présent travail	Alb *a.b.c.d.e.f.g.h.i.j.k.l.*		
	← Glob I →	← Glob. II →	← Glob. III →
FEILLET (1965)	← Gliadines →	← Albumines →	← Globulines →
		← Globulines →	
ELTON et EWART (1962)	← Gliadines →	← Albumines →	← Globulines →
GEHRKE et *al.* (1964)	← S-zone → ← A_s →	←G_s→←Base→←A_f→	← G_f →

Des travaux antérieurs (FEILLET, 1965) nous ayant amené à conclure à l'individualité des groupes protéiques définis par OSBORNE, nous avons une certaine difficulté à accepter les propositions de GEHRKE sur l'existence de *protéines de base* ; nous ne pensons d'ailleurs pas, comme l'affirme cet auteur, que l'alpha et la beta-gliadines de WOYCHIK et *al.* (1961) puissent être confondues avec les albumines d'ELTON et EWART (1962) ; il nous semble, de plus, que la zone G_s de GEHRKE n'est pas spécifique des globulines, certaines albumines ayant la même mobilité.

Les protéines insolubles dans l'eau se révèlent également très hétérogènes : l'électrophorèse à pH = 3,2 permet d'y distinguer trois groupes de constituants (numérotés I, II et III, dans l'ordre des mobilités croissantes) : le groupe I est constitué d'une dizaine de fractions mal différenciées dont la mobilité s'apparente à celle des gliadines ; le groupe II, également polydispersé, migre dans la zone des albumines; le groupe III, enfin, très mobile, possède 4 fractions nettement individualisées.

En plus des globulines rapides III (ELTON et EWART, 1962) et des globulines lentes II (GHERKE et *al.*, 1964), il existerait donc également des globulines I de très faibles mobilités; il est néanmoins possible que ces deux derniers groupes soient constitués, au moins partiellement, de gliadines et d'albumines qui auraient été dénaturées au cours de l'extraction. Il demeure donc indispensable d'isoler les 3 groupes protéiques constitutifs des P. I. E. avant de conclure à l'individualité des globulines I et II.

Un examen attentif de la planche I permet de dégager par ailleurs les faits suivants:

a) la fraction *Albumine 19* est absente de ALB. A, mais se retrouve plus concentrée dans ALB. B; comme il en est de même de l'*Albumine l*, on peut supposer que les constituants *19* et *l* représentent la même protéine (pH = 8,9 et 3,2).

b) l'appauvrissement des ALB. B en *Albumine 12* montre que cette fraction précipite plus complètement dans $(NH_4)_2SO_4$ 2 M que *Albumine 13*; il en est de même des albumines plus électronégatives qui se concentrent donc dans ALB. A (pH = 8,9).

c) le groupe III des globulines est plus concentré, mais moins bien séparé dans GLOB. B que dans GLOB. A (pH = 3,2).

d) bien visibles dans les P. S. S., les globulines III sont encore présentes dans les P. S. E., mais semblent totalement absentes des ALB. A, ce qui explique la solubilité presque totale (99 p. 100) de cette dernière préparation dans l'eau (pH = 3,2).

CONCLUSIONS

Contrairement à l'opinion d'un certain nombre d'auteurs, il semble bien que l'on puisse différencier les albumines des globulines par leur solubilité dans l'eau ; il est en effet possible, ainsi que le montre ce travail, d'isoler par relargage des protéines totablement solubles dans l'eau (albumines) et d'autres presque complètement insolubles (les globulines). En raison, en particulier, de l'hydrosolubilité des gliadines, cela ne signifie certes pas que les définitions d'Osborne doivent être considérées comme un critère absolu de différenciation entre les groupes protéiques du blé ; mais il n'en demeure pas moins qu'elles peuvent servir de base à tout travail expérimental sur les protéines solubles.

En ce qui concerne les préparations que nous avons isolées, les ALB. A semblent les mieux représentatives du groupe des albumines ; en dépit de l'absence de l'*albumine 19*, elles sont en effet les plus riches en azote, totalement solubles dans l'eau et donc, ainsi que le confirme l'électrophorèse, dépourvues de globuline. Malgré leur appauvrissement en Globulines III, les GLOB. A apparaissent également bien caractériser le groupe des Globulines.

Ce travail précise enfin l'extrême complexité des albumines et des globulines. Malgré le nombre élevé de fractions décelées, il est néanmoins probable que la quantité exacte d'entités protéiques présentes dans un extrait salin est bien supérieur puisque, protéines cytoplasmiques, les protéines solubles recèlent la majorité des enzymes présents dans le grain. Parmi les nombreuses protéines séparées en électrophorèse, l'*albumine 13* apparaît quantitativement la plus importante. Nous décrirons dans un prochain mémoire les méthodes de fractionnement retenues pour isoler cette fraction à l'état purifié.

Reçu pour publication en juin 1968.

SUMMARY

SOLUBLE WHEAT PROTEINS.

I. — ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ALBUMINS AND GLOBULINS

The Albumins and Globulins of wheat flour (*T. vulgare*), parted by dialysis of a saline extract, are purified by salting out with ammonium sulfate (table 1). The physicochemical study of the 7 preparations obtained confirms OSBORNE views on the solubility characteristics of these two protein groups, allows to verify the presence of phosphorus in the globulins and its absence in the albumins and specifies the nitrogenous content of the isolated proteins (table 2) ; the electrophoretic analysis of these preparations (fig. 1) allows to count 21 fractions in the albumins at pH = 8,9, but only 12 at pH = 3,2 ; the globulins, also very heterogeneous, are subdivided into 3 groups in terms of their mobility. A relationship between the nomenclatures used in the present paper and those used by other authors is proposed (table 3).

ZUSAMMENFASSUNG

DIE LÖSLICHEN PROTEINE DES WEIZENS.

I. — ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ALBUMINE UND GLOBULINE

Die durch Dialyse eines salzhaltigen Extraktes getrennten Albumine und Globuline des Weizenmehls (T. vulgare) werden in Gegenwart von Ammoniumsulfat gereinigt (Abb. 1). Die physikalisch-chemische Untersuchung der 7 erhaltenen Präparate bestätigt die von OSBORNE vertretene Ansicht über die Löslichkeitseigenschaften dieser zwei proteinhaltigen Gruppen und erlaubt es, die Anwesenheit von Phosphor im Globulin und dessen Abwesenheit im Albumin nachzuweisen, ferner den Stickstoffgehalt der isolierten Proteine (Abb. 2) zu bestimmen. Die elektrophoretische Analyse derselben Präparate (Figur 1) erlaubt es, 21 Fraktionen in den Albuminen bei pH = 8,9 und nur 12 bei pH = 3,2 festzustellen.

Die ebenfalls sehr heterogenen Globuline sind :

1) je nach ihrem Beweglichkeitsgrad in drei Gruppen untergeteilt. Schliesslich wird eine ;

2) Gegenüberstellung der in der vorliegenden Arbeit und der von anderen Autoren gebrauchten Nomenklaturen vorgeschlagen (Abb. 3).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOURDET A., FEILLET P., 1967. Distribution of phosphorus compounds in the protein fractions of various types of wheat flours. *Cereal Chem.*, **44**, 457-482.

BRIGGS A. P., 1922. A modification of the Bell-Doisy phosphate method. *J. biol. Chem.*, **53**, 13-16.

ELTON G. A. H., EWART J. A. D., 1962. Starch-gel electrophoresis of cereal proteins *J. Sci. Food Agric.* **13**, 62-72.

FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. *Ann. Technol. agric.*, **14**, hors-série 1, 1-94.

FEILLET P., 1967 *a*. Les protéines solubles des céréales (mise au point bibliographique). *Ann. Technol. agric.*, **16**, 135-182.

FEILLET P., 1967 *b*. Les protéines solubles de la farine ont-elles une importance technologique? *Technique Meuniire*, **111**, 8-11.

GEHRKE C. W., OH Y. H., FREEARK C. W., 1964. Chemical fractionation and starch gel urea electrophoretic characterization of albumins, globulins, gliadins and glutenins in solft wheat. *Anal. Biochem.*, 7, 439-460.

MACHEBŒUF M., DELSAL J., 1943. Sur le dosage de très petites quantités de phosphate dans les matières organiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **25**, 116-120.

MIKOLA J., 1965. Disk electrophoresis studies on the basic proteins of barley grain. *Ann. Acad. Sci. Fennica* série A, **11**, n° 130.

NIMMO C. C., O'SULLIVAN M. T., MOHAMMAD A., PENCE J. W., 1963. Fractionation and zone electrophoresis of proteins of water soluble materials of flour. *Cereal Chem.*, **40**, 390-398.

OSBORNE T. B., 1907. *The Proteins of the wheat kernel.* Carnegie Institution of Washington, pub. n° 84.

PENCE J. W., 1953. Approximate isoelectric pH's of albumins from wheat flour. *Cereal Chem.*, **30**, 328-333.

PENCE J. W., ELDER A. H., 1953. The albumins and globulins proteins of wheat. *Cereal Chem.* **30**, 275-287.

TKACHUK R., 1966. Note on the nitrogen to protein conversion factor for wheat flour. *Cereal Chem.*, **43**, 223-225.

WOYCHIK J. H., BOUNDY J. A., DIMLER R' J., 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 477-482.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 227-236.

ÉTAT THERMODYNAMIQUE DE L'EAU DANS LES GRAINS DE BLÉS SAINS OU ALTÉRÉS

J. PELHATE

Laboratoire de Biologie végétale,
Faculté des Sciences, 29 N - Brest

SOMMAIRE

La simple évaluation de la teneur en eau d'un lot de grains est insuffisante pour prévoir son aptitude à une bonne conservation.

La méthode des équilibres hygroscopiques permet de préciser l'état thermodynamique de l'eau des blés et de leurs moisissures.

Les pF observés pour plusieurs lots de blés et pour deux moisissures (*Aspergillus echinulatus* et *Penicillium cyclopium*) présentent une grande disparité ; celle-ci permet d'expliquer le comportement original du complexe grain + moisissures.

INTRODUCTION

Le contrôle de l'humidité du grain renseigne sur sa condition physique et sur son aptitude à la conservation. L'évolution d'une mycoflore épiphyte dégradante est en effet liée au taux d'hydratation des blés (Christensen, 1957).

Pourtant, il arrive que des prévisions d'altération fondées sur ce paramètre déterminant (Nuret et Schribaux, 1953) ne soient pas vérifiées : deux lots de même teneur en eau se comportent différemment vis-à-vis des moisissures. La notion simple de « teneur en eau » du substrat est donc insuffisante pour apprécier l'état d'humidité réelle du grain (Guilbot, 1959-1963 ; Leroy, 1959).

L'eau des tissus végétaux et des substances biologiques présente des degrés divers de liaison ; on distingue l' « eau libre » et l' « eau liée ». Cette dernière se caractérise par la grande énergie nécessaire à son extraction ; elle correspond à diverses actions s'exerçant entre l'eau et le substrat et relevant des phénomènes d'adsorption, de capillarité et d'osmose.

Il convient donc d'évaluer, sur le substrat grain, la fraction d'eau disponibl pour les champignons doués d'une certaine « force de succion ».

Le comportement hydrique des grains est généralement suivi sur des courbe exprimant, à température donnée, la teneur en eau en fonction de l'humidité relative

Il apparaît que l'humidité relative permet de définir l'état thermodynamique d l'eau ; celui-ci peut être exprimé par la variation d'enthalpie libre entre 1 g d'ea de la substance et 1 g d'eau libre. Plus simplement, il s'agit de l'énergie nécessair pour faire passer 1 g d'eau liée à l'état d'eau libre, d'où le terme de potentiel de l'eau encore utilisé.

Un raisonnement simple conduit à l'expression suivante de la variation d'enthalpie libre ou potentiel (HALLAIRE, 1960) :

$$\Psi = \frac{RT}{M} \log \frac{100}{e}$$

avec R = constante des gaz parfaits
T = température absolue
M = masse moléculaire de l'eau
e = degré hygrométrique ou humidité relative notée en p. 100

Nous rappelons que l'humidité relative correspond au rapport de la tension d vapeur d'eau du milieu à la tension de vapeur d'eau saturante, pour une même tempé rature.

Nous suivrons l'évolution du potentiel de l'eau en fonction de l'hydratation, chez des grains différant par leur état physiologique ou sanitaire, en vue d'interpréter le comportement global des blés infectés.

DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES COURBES DE SORPTION DU GRAIN

A. — *Matériel utilisé*

Les échantillons sont répartis en 3 séries.

1° *Blés de conditions physiologiques différentes.*

Les grains ont été désinfectés à l'hypochlorite de sodium avant leur mise en expérience.
— Blé témoin (variété *Cappelle*) de la récolte 1966, en très bon état.
— Blé de même origine, mais dont les caryopses sont coupés suivant le plan du sillon.
— Blé issu du lot témoin, ayant perdu toute faculté germinative par traitement des caryopses à l'oxyde d'éthylène appliqué à la dose létale de 250 g/m³ pendant 4 h.
— Blé ayant perdu toute faculté germinative et altéré par les moisissures, à la suite d'une mauvaise conservation.
— Blé de la récolte 1962 dont le pouvoir germinatif reste élevé (97 p. 100) grâce à d'excellentes conditions de conservation.

2° *Blés infectés.*

— Blé moisi spontanément (voir série précédente).
— Blé témoin, désinfecté puis inoculé, avant sa mise en équilibre hydrique, avec l'*Aspergillus echinulatus* ou le *Penicillium cyclopium*, deux espèces communément isolées sur grains.

3° *Champignons.*

— Thalles sporulés de deux espèces (*A. echinulatus* et *P. cyclopium*), cultivés sur deux milieux réalisant des pressions osmotiques différentes (Malt 2 p. 100, gélosé ; Malt 2 p. 100 + NaCl 7 p. 100 gélosé) puis séparés de leur substrat ; une feuille de cellophane interposée entre le milieu et le thalle facilite cette dernière opération.

B. — *Mode opératoire*

L'équilibre hydrique des grains et des thalles de champignons est réalisé en phase vapeur, dans une enceinte à atmosphère contrôlée (fig. 1). La température de 15°C est maintenue en portant le caisson en étuve thermostatée. Le degré hygrométrique, mesuré au psychromètre, est entretenu par la tension de vapeur d'eau constante d'une solution d'acide sulfurique ; les valeurs obtenues sont en accord avec celles établies d'après le titre de la solution utilisée.

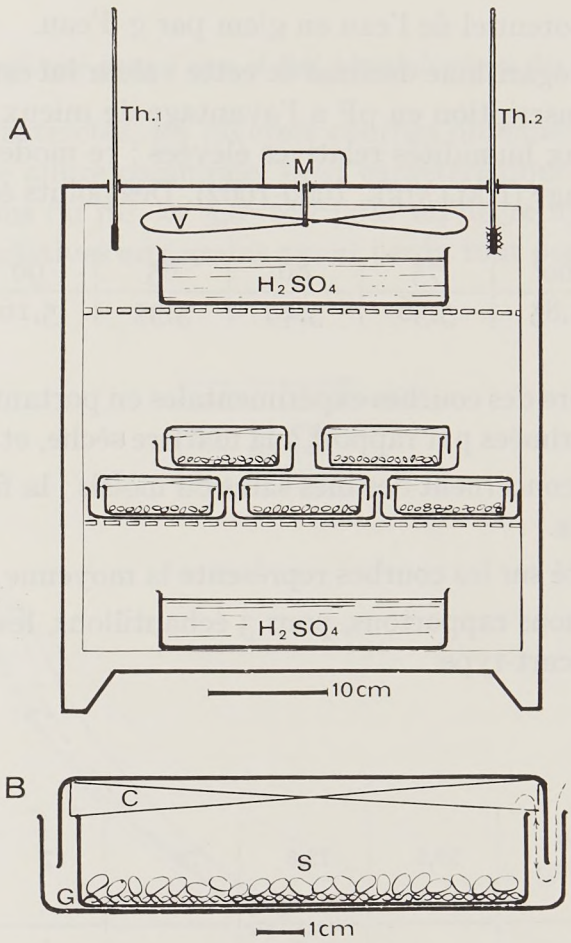


FIG. 1. — *Enceinte à atmosphère contrôlée*

A : Caisson étanche (plexiglas) ; Th : thermomètres (psychromètre)
V : ventilateur actionné par le moteur M.
B : Boîte de Petri avec circulation d'air en chicane
C : croisillon intercalaire
S : substrat à étudier
G : grillage inaltérable.

Tout en assurant le brassage de l'atmosphère pour faciliter les échanges hydriques, on doit éviter les pollutions des substrats (circulation d'air en chicane).

La nécessité de désinfecter les grains par voie humide (ClONa) nous amène à rétablir l'équilibre hygroscopique par désorption ; au départ, les caryopses ont une teneur en eau d'environ 22 p. 100 (par rapport au poids frais). La teneur en eau des thalles de champignons est alors de l'ordre de 95 p. 100.

La stabilité est atteinte après une durée moyenne d'un mois. Notons que les dispositifs à circulation d'air, notamment préconisés par MULTON et GUILBOT (1967), doivent permettre de réduire ce temps.

La teneur en eau des échantillons (grains ou thalles) est mesurée par séchage à l'étuve à 105° pendant 24 h, après ressuyage dans le cas des thalles.

C. — *Résultats*

La formule de la variation de potentiel précédemment indiquée aboutit à l'expression suivante :

$$\psi = 10\,845\ T \log \frac{100}{e},$$

lorsqu'on exprime le potentiel de l'eau en g/cm par g d'eau.

Pratiquement, le logarithme décimal de cette valeur lui est substitué sous la désignation de pF. La transcription en pF a l'avantage de mieux accuser les différences d'affinité pour l'eau aux humidités relatives élevées ; ce mode d'expression est d'ailleurs consacré par l'usage (HALLAIRE, 1960-1962). Des points échelonnés :

soit e	60	75	80	85	90	95
pF	5,85	5,56	5,49	5,35	5,16	4,85

ont permis de construire des courbes expérimentales en portant en abscisse les teneurs en eau du substrat exprimées par rapport à la matière sèche, et en ordonnée le pF.

Les figures 2 et 4 concernent des blés sains ou moisis ; la figure 3 est relative aux thalles de champignons.

Chaque point porté sur les courbes représente la moyenne de 5 répétitions.

A titre indicatif, nous rapportons, pour 3 échantillons, les moyennes des teneurs en eau, affectées de l'écart-type.

1° *Blé témoin* :

Humidités relatives (%)	59,5	72,8	79	87	90
Moyenne	15,20	18,75	19,84	24,53	31,78
Écart-type	0,06	0,09	0,13	0,13	0,14

2° *Blé altéré moisi* :

Humidités relatives (%)	59,5	72,8	79	87	90
Moyenne	15,77	18,64	20,90	28,64	48,97
Écart-type	0,11	0,14	0,11	0,12	0,34

3° *Thalle de* l'Aspergillus echinulatus (*sur malt*) :

Humidités relatives (%)	60	75	85	95
Moyenne	27,63	34,90	82,14	431,47
Écart-type	0,09	0,29	0,35	1,18

INTERPRÉTATION

A. — *Courbes d'affinité pour l'eau et état physiologique des grains de blé* (fig. 2)

Tout en restant distinctes, les diverses courbes obtenues pour les grains de blé viables présentent une allure commune. Leur caractéristique essentielle est le point d'inflexion aux environs du pF = 5,6 (soit pour un degré hygrométrique de 75). A l'inverse, les courbes relatives aux grains ayant perdu tout pouvoir germinatif (traités

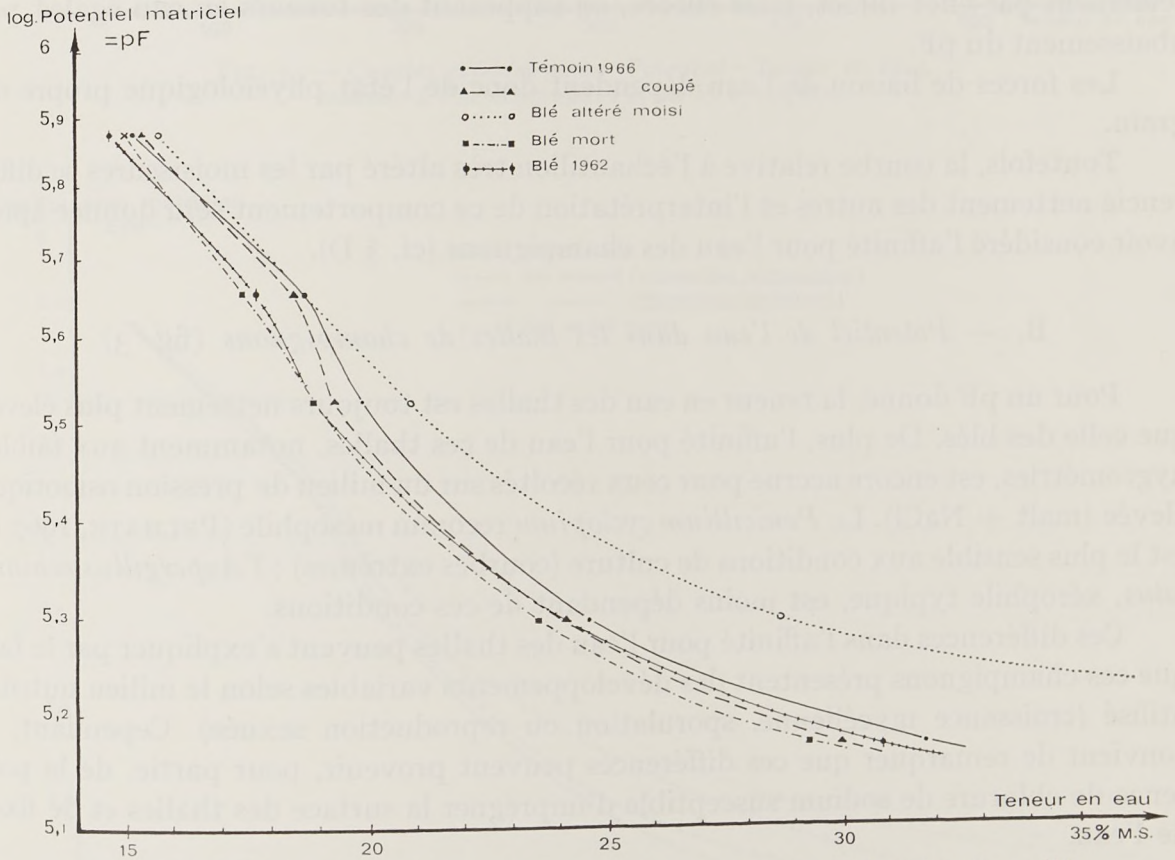


FIG. 2. — *Courbes expérimentales* (Potentiel - Teneur en eau) *relatives à quelques blés de conditions physiologiques différentes*

par l'oxyde d'éthylène ou très altérés par les moisissures) ne présentent pas de point d'inflexion ; ce fait est à rapprocher des observations faites sur les matériaux de nature minérale comme les sols (DOMMERGUES, 1962).

On peut se demander si le décrochement observé dans les courbes obtenues sur grains viables n'est pas dû à des modifications des constituants du grain sous l'action des enzymes. Ces modifications sont en effet susceptibles de se produire à partir d'humidités relatives voisines de 75 p. 100 et d'influencer l'affinité pour l'eau du grain (DRAPRON, 1961).

La diminution du pouvoir de rétention en eau des grains les plus âgés pourrait dans ce cas résulter d'une diminution de certaines de leurs activités enzymatiques (GUILBOT, POISSON, 1963).

Le sectionnement des grains abaisse également la quantité d'eau qu'ils peuvent retenir. Deux interprétations peuvent être avancées :

— les caryopses ainsi lésés présentent des activités métaboliques différentes de celles des grains entiers et leur hygroscopicité en est altérée ;

— la diffusion de l'eau de l'intérieur du grain vers l'extérieur est facilitée par cette réduction de volume et le pseudo-équilibre obtenu en désorption se situe à un niveau de teneur en eau inférieur à celui obtenu avec des grains entiers.

Soulignons que ces pseudo-équilibres peuvent être très durables (plus de 6 mois dans un essai en cours, à 25°C).

De toute façon, les téguments jouent un rôle prépondérant dans l'équilibre hydrique. La lésion des assises protectrices favorise l'installation des moisissures non seulement par effet direct, mais encore, en supposant des teneurs en eau égales, par abaissement du pF.

Les forces de liaison de l'eau dépendent donc de l'état physiologique propre du grain.

Toutefois, la courbe relative à l'échantillon très altéré par les moisissures se différencie nettement des autres et l'interprétation de ce comportement sera donnée après avoir considéré l'affinité pour l'eau des champignons (cf. § D).

B. — *Potentiel de l'eau dans les thalles de champignons* (fig. 3)

Pour un pF donné, la teneur en eau des thalles est toujours nettement plus élevée que celle des blés. De plus, l'affinité pour l'eau de ces thalles, notamment aux faibles hygrométries, est encore accrue pour ceux récoltés sur un milieu de pression osmotique élevée (malt + NaCl). Le *Penicillium cyclopium* reconnu mésophile (PELHATE, 1967 *b*) est le plus sensible aux conditions de culture (courbes extrêmes) ; l'*Aspergillus echinulatus*, xérophile typique, est moins dépendant de ces conditions.

Ces différences dans l'affinité pour l'eau des thalles peuvent s'expliquer par le fait que ces champignons présentent des développements variables selon le milieu nutritif utilisé (croissance mycélienne, sporulation ou reproduction sexuée). Cependant, il convient de remarquer que ces différences peuvent provenir, pour partie, de la présence de chlorure de sodium susceptible d'imprégner la surface des thalles et de fixer de l'eau.

C. — *Potentiel des blés infectés* (fig. 4)

Toutes les courbes relatives aux lots infectés traduisent, à pF égal, une humidité supérieure à celle du témoin. La courbe du blé inoculé par l'*A. echinulatus* se détache de celle du témoin dès les faibles hygrométries, l'espèce s'installant dans ces conditions, à l'inverse du *P. cyclopium* plus exigeant en eau.

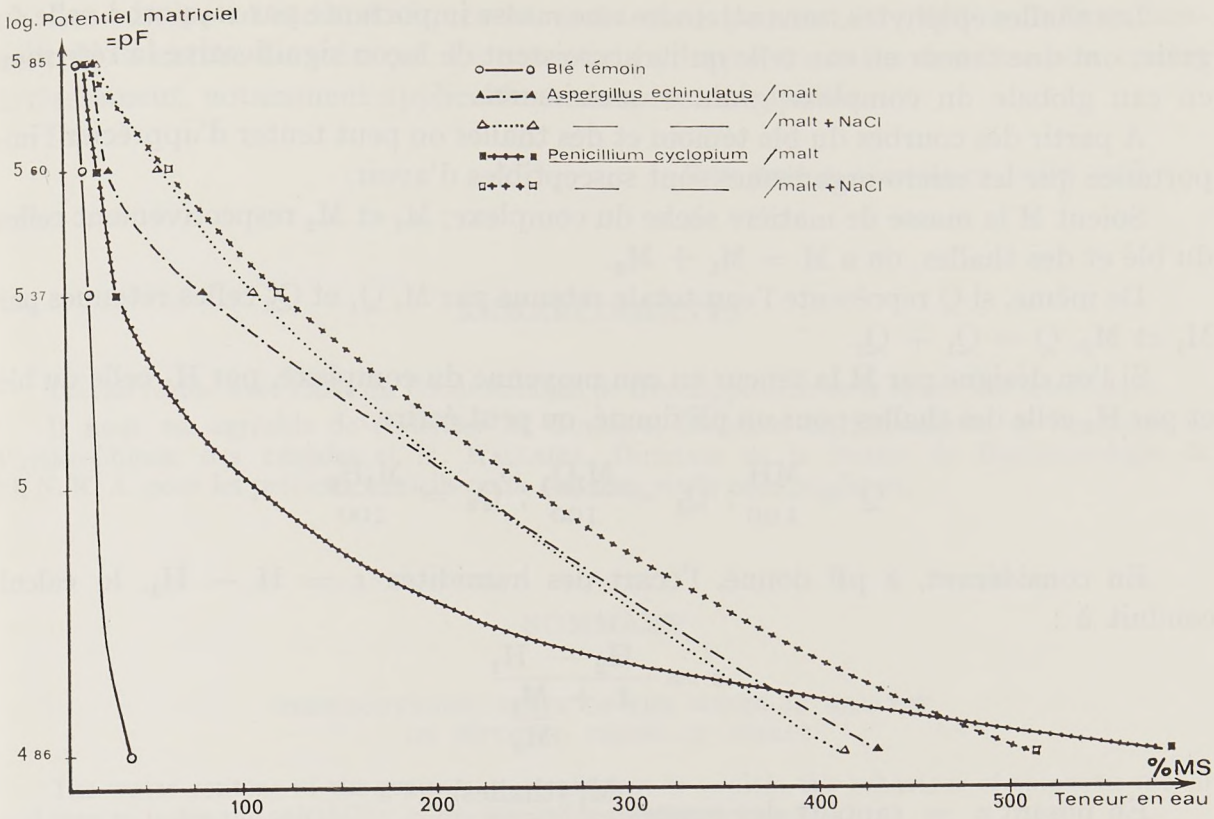


FIG. 3. — *Courbes expérimentales* (Potentiel - Teneur en eau), *relatives à l'*A. echinulatus *et au* P. cyclopium

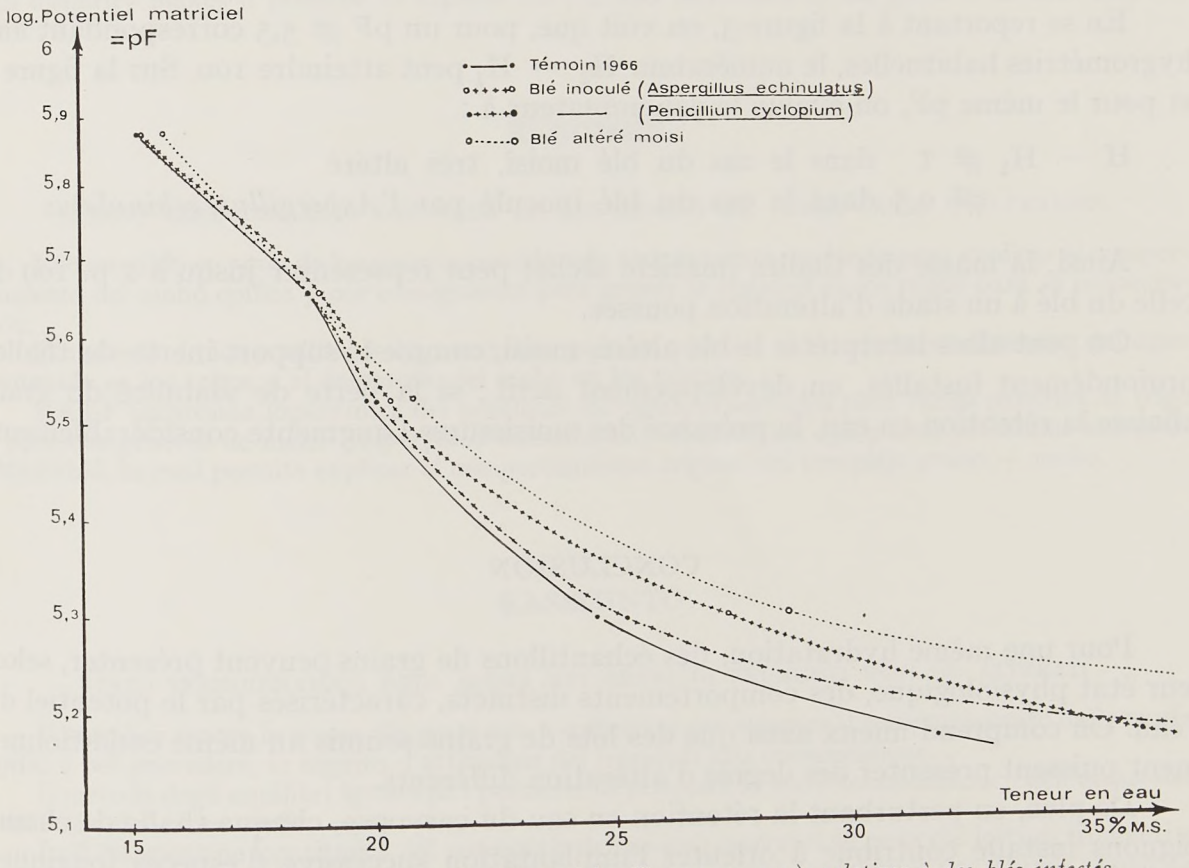


FIG. 4. — *Courbes expérimentales* (Potentiel - Teneur en eau), *relatives à des blés infectés.*

Les thalles épiphytes, sans atteindre une masse importante par rapport à celle d grain, ont une teneur en eau telle qu'ils accroissent de façon significative la rétentio en eau globale du complexe grain + moisissures.

A partir des courbes du blé témoin et des thalles on peut tenter d'apprécier l'im portance que les micro-organismes sont susceptibles d'avoir.

Soient M la masse de matière sèche du complexe, M_1 et M_2 respectivement celle du blé et des thalles, on a $M = M_1 + M_2$.

De même, si Q représente l'eau totale retenue par M, Q_1 et Q_2 celles retenues pa M_1 et M_2, $Q = Q_1 + Q_2$.

Si l'on désigne par H la teneur en eau moyenne du complexe, par H_1 celle du bl et par H_2 celle des thalles pour un pF donné, on peut écrire :

$$Q = \frac{MH}{100} \; ; \; Q_1 = \frac{M_1 Q_1}{100} \; ; \; Q_2 = \frac{M_2 H_2}{100}$$

En considérant, à pF donné, l'écart des humidités $\varepsilon = H - H_1$, le calcu conduit à :

$$\varepsilon = \frac{H_2 - H_1}{1 + \dfrac{M_1}{M_2}}$$

En posant ρ = rapport des masses $\dfrac{M_1}{M_2}\dfrac{\text{(thalles)}}{\text{(blé)}}$

on a

$$\rho = \frac{H_2 - H_1}{H - H_1} - 1$$

En se reportant à la figure 3, on voit que, pour un pF $\#$ 5,5 correspondant au hygrométries habituelles, le numérateur $H_2 - H_1$ peut atteindre 100. Sur la figure et pour le même pF, on évalue le dénominateur à :

$H - H_1 \# 1$ dans le cas du blé moisi, très altéré
$\# 0{,}5$ dans le cas du blé inoculé par l'*Aspergillus echinulatus*

Ainsi, la masse des thalles (matière sèche) peut représenter jusqu'à 1 p. 100 d celle du blé à un stade d'altération poussée.

On peut alors interpréter le blé altéré, moisi, comme le support inerte de thalle profondément installés, en développement actif ; si la perte de viabilité du grai abaisse la rétention en eau, la présence des moisissures l'augmente considérablement.

CONCLUSION

Pour une même hydratation, des échantillons de grains peuvent présenter, selo leur état physiologique, des comportements distincts, caractérisés par le potentiel d l'eau. On comprend mieux ainsi que des lots de grains soumis au même conditionne ment puissent présenter des degrés d'altération différents.

De plus, en perturbant la rétention en eau du caryopse, chaque thalle de cham pignons installé contribue à orienter l'implantation successive d'espèces fongique différentes.

Les besoins en eau spécifiques des moisissures peuvent être définis indépendamment de la nature du substrat. Le potentiel hydrique constitue donc un bon critère de classement, notamment applicable aux espèces xérophiles.

Reçu pour publication en juillet 1968.

REMERCIEMENTS

Travail réalisé avec l'aide du Fonds national de Développement de la Recherche scientifique.

Il nous est agréable de remercier M. GUILBOT, Directeur du Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des céréales et M. HALLAIRE, Directeur de la Station de Bioclimatologie de l'I. N. R. A. pour les précieux conseils qu'ils ont bien voulu nous prodiguer.

SUMMARY

THERMODYNAMIC STATE OF THE WATER IN HEALTHY OR INFECTED GRAINS OF WHEAT

The water content of the grains is not sufficient to explain the behaviour of epiphytic mould and then to judge the suitability of the wheat for storage purposes.

The hygroscopic equilibrium method makes it possible to determine the thermodynamic state of the water in the grains of wheat and their mould.

The pF (logarithmic expression of the water potential) observed for several batches of wheat and for two types of moulds (*Aspergillus echinulatus* and *Penicillium cyclopium*) differs considera,ly ; this disparity makes it possible to explain the peculiar behaviour of the grain + mould complex.

RESUMEN

ESTADO TERMODINAMICO DEL AGUA EN LOS GRANOS DE TRIGO, SANOS O ALTERADOS

El contenido en agua de los granos, considerado aisladamente, no basta para explicar el comportamiento del moho epifite y por consiguiente para prever la aptidud de los trigos para su conservación.

El método de los equilibrios higroscópicos permite precisar el estado termodinámico del agua contenida en los trigos y el desarrollo del moho en los mismos.

Los pF (expresión logaritmica del potencial del agua) observados para varias partidas de trigo y para dos géneros de moho (*Aspergillus echinulatus* y *Penicillium cyclopium*) presentan una gran disparidad, la cual permite explicar el comportamiento original del complejo grano + moho.

RASSIUNTO

STATO TERMODINAMICO DELL ACQUA NEI GRANI DI FRUMENTI SANI OD ALTERATI

Il semplice tenore in acqua dei grani non è sufficiente per spiegare il comportamento delle muffe epifiti e per prevedere, in seguito, l'attitudine dei frumenti alla conservazione.

Il metodo degli equilibri igroscopici permette di precisare lo stato termodinamico dell'acqua dei frumenti e delle loro muffe.

I pF (espressione logaritmica del potenziale dell'acqua) osservati su parecchi lotti di frumenti e per due muffe (*Aspergillus echinulatus* e *Penicillium cyclopium*) presentano una grande disparità questa permette di spiegare il comportamento originale del complesso frumento + muffe.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHRISTENSEN C. M., 1957. Deterioration of stored grains by fungi. *Bot. Rev.*, **23** (2), 108-134.

DOMMERGUES Y., 1962. *Contribution à l'étude de la dynamique microbienne des sols en zone semi-aride en zone tropicale sèche.* Thèse, Fac. Sci. Paris.

DRAPRON R., 1961. *Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés : la dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température* Thèse, Ingénieur C. N. A. M.

GUILBOT A., POISSON J., 1963. *Conditions de stockage et durée de conservation des grains.* I. T. C. F. Paris.

GUILBOT A., 1965. *Le dosage rapide de l'eau dans les grains.* I. T. C. F. Paris.

HALLAIRE M., 1960. L'eau et le sol. *Technol. agric.*, **1**, 2, 1-20.

HALLAIRE M., BALDY C. H., 1962. Potentiel matriciel de l'eau dans les matériaux poreux et tension superficielle de l'eau. *Journées de l'hydraulique*, **6** *c*, 2, 1-7.

LEROY M., 1959. L'humidité des grains : méthodes modernes de conservation. *Bull. Éc. fr. Meun.*, **170** 91-100.

MOREAU C., MOREAU M., PELHATE J., 1964. Choix de milieux de culture sélectifs pour l'analyse des mycoflores osmophiles. *Bull. Soc. Mycol. Fr*, **80** (2), 243-246.

MULTON J. L., GUILBOT A., 1967. Méthode de détermination rapide des isothermes de sorption de vapeur d'eau. *Ann. Technol. agric.* **16** (1), 5-25.

NURET H., SCHRIBAUX P., 1953. Expression graphique d'une formule analytique traduisant les états de stabilité ou d'instabilité d'une masse de graines saines. *C. R. Acad. Sci.*, **237**, 10.

PELHATE J., 1967 *a*. Résistance du caryopse de blé à l'envahissement par les moisissures. *Bull. Soc. Bot. Fr* (sous presse).

PELHATE J., 1967 *b*. Recherche des besoins en eau chez quelques moisissures des grains. *Mycopathologia et Mycologia applicata* (sous presse).

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 237-240.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE DU GRAIN D'AMIDON AU MOYEN DE MÉTHODES PHYSIQUES ET ENZYMATIQUES (1)

Christiane MERCIER

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés, 91 - Massy
Institut national de la Recherche agronomique

L'étude de la structure du grain d'amidon a fait l'objet, depuis plus de cent ans, d'un nombre considérable de travaux. Cependant, les résultats obtenus, provenant bien souvent d'analyses effectuées de manière très disparate, conduisent à des conclusions parfois contradictoires.

Depuis une quinzaine d'années, l'utilisation de nouvelles méthodes physiques, telles que la spectroscopie hertzienne, la microscopie électronique et la spectrodiffractométrie, méthode améliorée de diffraction des rayons X, a permis de réaliser des progrès sensibles relativement à la connaissance de la structure physique de l'amidon. Par ailleurs, l'actuelle possibilité d'obtenir des enzymes d'activité spécifique permet d'acquérir, par voie enzymatique, des informations plus précises sur la structure chimique des amidons.

Il est généralement admis que le grain d'amidon n'est pas constitué d'une substance pure au sens classique de la chimie organique ; de plus sa structure physique et sa constitution chimique varient suivant l'origine botanique et l'état de maturité de l'organe de réserve amylacée considéré. Les amidons natifs peuvent être classés en deux grands groupes dont les types respectifs sont représentés par les amidons normaux de céréales et les amidons de tubercules ; mais il est apparu que des amidons tels que ceux de maïs riches en amylopectine ou en amylose se classaient dans l'un ou l'autre de ces groupes selon le critère de classement retenu : diffraction des rayons X, sensibilité aux enzymes, comportement à l'égard de traitements hydrothermiques. De plus, alors que l'amidon de pomme de terre présente un spectre de diffraction et une aptitude au gonflement hydrothermique traduisant une moins grande cohésion de structure que celui des amidons de céréales, il est par contre beaucoup plus résis-

(1) Résumé de la thèse de Doctorat ès sciences naturelles préparée à la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, sous la direction de M. A. GUILBOT, et soutenue le 25 juin 1968 à la Faculté des Sciences de Paris, avec le patronage de Mlle E. LE BRETON, Professeur.

tant que ceux-ci à l'action de l'α-amylase. Les hypothèses suggérées pour expliquer ces faits ne rendent pas compte de l'ensemble des phénomènes observés.

C'est pour tenter d'apporter une explication cohérente à ces différences importantes de comportement entre amidons que nous avons repris l'examen de l'organisation granulaire des amidons et l'étude de certaines caractéristiques de leur α-amylolyse après avoir montré que cette dernière est essentiellement sous la dépendance de l'état du substrat. Les amidons étudiés diffèrent :

— soit par leur origine botanique (amidons de pomme de terre, de blé et maïs)

— soit par leur teneur en amylose (amidon de maïs cireux à moins de 1 p. 100 d'amylose, amidons de maïs à 34,2 et 72 p. 100 d'amylose) ;

— soit par leur organisation cristalline (spectre A des amidons de céréales et spectre B de l'amidon de pomme de terre et des amylomaïs).

Pour essayer de mieux connaître les différences entre les structures granulaires de types d'amidon, nous avons d'abord soumis divers amidons à des traitements provoquant une dégradation progressive de leur structure, tels un traitement mécanique par pression et des traitements thermiques, (séchage, chaleur humide, empesage) effectués dans différentes conditions d'hydratation .

Les amidons natifs et modifiés ont ensuite été étudiés afin :

— d'une part, de déterminer, par des méthodes biochimiques, les caractéristiques de leur hydrolyse par l'α-amylase bactérienne ainsi que la structure chimique de leur fraction ramifiée ;

— d'autre part, d'apprécier, par des méthodes physiques, la structure fine des grains de ces amidons avant et après dégradation α-amylasique.

Afin de mieux distinguer les différentes composantes intervenant dans la cinétique d'α-amylolyse, nous avons mis au point un mode opératoire conduisant à définir arbitrairement les vitesses initiale et finale d'attaque, ainsi que la fraction d'amidon facilement attaquable. Ces données, qui n'ont pas de valeur intrinsèque, permettent cependant une comparaison plus précise des divers amidons. De plus, l'examen qualitatif de la fraction glucidique éthanolosoluble, libérée au cours de la dégradation ainsi que les observations microscopiques de l'amidon résiduel, renseignent sur l'état de structure du grain.

Pour étudier la structure chimique de la fraction ramifiée des amidons, la technique a consisté d'abord à déramifier par la pullulanase, enzyme spécifique de la liaison α (1 → 6), les amidons empesés, puis à déterminer la longueur des chaînes linéaires obtenues après fractionnement sur gel de Sephadex, au moyen d'une méthode de coloration à l'iode ou par β-amylolyse.

Pour apprécier la structure fine des grains d'amidons et l'état d'association de leurs composants macromoléculaires, nous avons étudié :

— d'une part, le gonflement et la solubilité de l'amidon en fonction de la température, ce qui renseigne sur les types d'association entre les macromolécules ;

— d'autre part, les spectrodiffractogrammes X, qui indiquent le type d'organisation de la structure des grains ;

— enfin, nous avons effectué des observations aux microscopes optique et électronique, susceptibles d'apporter des renseignements sur la structure granulaire des amidons.

A la suite de l'étude comparée de l'α-amylolyse des amidons précités, nous avons

pu confirmer que les différences de sensibilité à l'action de l'α-amylase ne pouvaient être attribuées, ni à la différence de dimensions des grains, ni à la présence éventuelle d'une couche de lipides à leur surface.

La teneur en amylose du grain d'amidon, l'existence d'une organisation cristalline, ainsi que les différences de types de structure cristalline (spectres A et B) sont partiellement impliquées dans les différences de comportement des amidons vis-à-vis de l'α-amylase. Ainsi, la sensibilité à l'α-amylolyse décroît :

— avec la teneur en amylsoe dans le cas des amidons de maïs ;

— avec le passage de l'état « amorphe » à l'état organisé (spectre B) dans le cas d'un empois rétrogradé ;

— avec la transformation du spectre B en spectre A, au cours d'un traitement hydrothermique ménagé de l'amidon de pomme de terre (SCHOCH).

De plus, nous avons pu établir un rapport entre la facilité d'amylolyse et le mode d'attaque par l'α-amylase bactérienne des amidons crus de pomme de terre et d'amylomaïs d'une part, et ceux de blé et de maïs cireux et normal, d'autre part. Les grains des premiers semblent être attaqués l'un après l'autre, tandis qu'au contraire ceux des seconds subissent une hydrolyse partielle et simultanée qui les fragmente radialement et tangentiellement, chaque fragment paraissant aussi résistant que les grains entiers.

Les observations submicroscopiques de GUILBOT et LEVAVASSEUR ont conduit à représenter la structure du grain d'amidon de la manière suivante : le grain serait constitué de couches superposées de granules enchassés dans un réseau alvéolaire, les couches étant séparées par des zones plus denses appelées « enveloppes ».

A partir de ce modèle, nous avons formulé une hypothèse selon laquelle les « enveloppes » externe et interne opposeraient des différences de résistance à la pénétration de l'amylase, ce qui expliquerait pour une part très importante les différences de sensibilité des amidons crus. Dans le cas des grains d'amidons de pomme de terre et des amylomaïs, leur enveloppe externe serait plus résistante que leurs enveloppes internes puisque les grains attaqués sont complètement détruits sans altération apparente des autres grains. Par contre, dans le cas des grains d'amidons de blé et de maïs normal et cireux, qui présentent au cours de l'amylolyse une fragmentation radiale et tangentielle, il semble que la résistance des différentes enveloppes externe ou internes soit équivalente, mais inférieure en moyenne à celle de la membrane externe de l'amidon de pomme de terre et des amylomaïs.

Des altérations du grain, mêmes légères, pouvant se produire aussi bien au cours du séchage des grains de céréales qu'au cours de l'extraction et du séchage de l'amidon et susceptibles de modifier la résistance des « enveloppes », influencent très nettement la sensibilité de l'amidon à l'α-amylase.

Des examens, au microscope électronique, des amidons partiellement attaqués par l'α-amylase fournissent des arguments importants en faveur de l'hypothèse précédemment formulée.

Les études relatives à la capacité de gonflement et à la solubilisation de l'amidon en suspension aqueuse en fonction de la température nous ont permis de montrer l'existence de différences dans la force et l'importance des liaisons interchaînes selon les types d'amidon, la résistance des amidons au traitement allant en décroissant dans l'ordre suivant : amylomaïs, amidons de blé et de maïs cireux et amidon de pomme de terre.

L'importance de ces liaisons interchaînes apparaît d'autant plus grande que le chaînes sont plus linéaires : en effet, les amidons très riches en amylose ayant même spectre B que l'amidon de pomme de terre, présentent, par contre, des associations inter chaînes plus fortes que ce dernier puisque un traitement hydrothermique susceptibl de faire passer sa structure cristalline en type A ne modifie en rien celle des amylo maïs.

L'étude de la distribution des différentes fractions linéaires, obtenues après déra mification des amidons empesés, nous a permis de mettre en évidence la présenc d'une fraction importante de chaînes à degré de polymérisation voisin de 45, incom patible avec le modèle statistique de structure à ramification régulière proposé pa PEAT et *al.* Bien plus, la répartition des chaînes linéaires d'amylopectine en fonctio de leur degré de polymérisation apparaît très sensiblement différente suivant les type d'amidons considérés. L'amidon de pomme de terre et, peut-être, certains amidons d maïs riches en amylose, ont, en effet, une proportion de courtes chaînes plus faible qu les amidons de maïs cireux et normaux. Ces résultats, ainsi que ceux apportés pa d'autres auteurs sur l'existence de fractions à courtes chaînes sensiblement linéaire dans l'amidon de pomme de terre et les amylomaïs, constituent des éléments d'inter prétation du type d'organisation cristalline qui se forme lors de la biosynthèse de amidons.

En conclusion, les travaux réalisés ont permis d'apporter des éléments nouveau concernant la structure granulaire, l'état d'association macromoléculaire des amidon et la structure de leurs fractions ramifiées.

Ils mettent l'accent sur les causes des différences de sensibilité des amidons gra nulaires aux α-amylases. Cette sensibilité est d'une façon générale sous la dépendanc de l'accessibilité de l'α-amylase aux chaînes d'amidon.

Dans les amidons natifs, les différences importantes de résistance à l'α-amylolys observées en fonction de leur origine sont attribuées :

— aux différences existant dans les états d'association moléculaire des régio amorphes aussi bien que cristallines, les liaisons impliquées étant plus ou moins forte et nombreuses suivant la longueur des chaînes d'amylose et des segments linéaires de chaînes d'amylopectine ;

— à des différences de répartition des domaines cristallins et amorphes du grain

— à la présence éventuelle de couches de substances de nature protidique.

Les zones appelées « enveloppes », présentant une résistance particulière à la péné tration de l'enzyme, ou à son action, pourraient donc être de nature protidique o être constituées d'un assemblage particulièrement dense de macromolécules gluci diques fortement associées.

Reçu pour publication en juillet 1968.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 241-251.

NOTE TECHNIQUE

UTILISATION D'UN COMPTEUR DE PARTICULES POUR LA NUMÉRATION ET L'ÉTUDE DE LA TAILLE DES LEVURES DE VIN

Suzanne LAFON-LAFOURCADE (1)

Institut d'Œnologie,
Faculté des Sciences de Bordeaux,
351, *Cours de la Libération, 33 - Talence*

SOMMAIRE

Cette étude concerne la possibilité d'application d'un compteur électronique de particules à l'étude de la multiplication des levures au cours de la fermentation. Cet appareil permet un travail de numération plus rapide que le comptage à l'hématimètre sous le microscope et donne des résultats plus reproductibles. Il a l'avantage supplémentaire d'indiquer la répartition des cellules comptées selon leur grosseur.

INTRODUCTION

On est souvent amené dans l'étude des fermentations et dans la pratique œnologique à effectuer des dénombrements de levures et de bactéries, ou encore de particules inertes. Ces déterminations sont obtenues par comptage sous le microscope à l'hématimètre ou encore par néphélométrie.

Il nous a paru intéressant d'adjoindre à ces techniques celle, plus récente, du comptage électronique (KUBITSCHEK, 1958; TOENNIS et coll., 1961, GUICHARD, 1965; PONTIGNY, 1966) utilisée depuis quelques années déjà pour la numération des éléments figurés du sang et susceptible d'apporter à ces problèmes œnologiques des indications

(1) Chargée de Recherches à l'Institut national de la Recherche agronomique.

supplémentaires et une plus grande précision. L'avantage du compteur électronique, en effet, réside dans sa rapidité, son automatisme, mais surtout dans le fait qu'il permet de connaître la distribution des particules comptées suivant leur grosseur.

Nous avons utilisé un compteur Coulter, « modèle A Spécial Bactéries », permettant couramment des numérations de particules à partir de 2 μ de diamètre et dans certaines conditions à partir de 0,6 μ. Nous exposons ici l'application de cet appareil à l'étude de la multiplication des levures dans le moût de raisin. DEYSSON et THI LAU (1963) ont déjà étudié de cette façon la croissance et la sporulation de *Saccharomycodes ludwigii* et ZELLNER et coll. (1963) de *Rhodotorula glutinis*. BENDA et WOLF (1965) ont également utilisé le comptage électronique à la comparaison de deux souches de *Saccharomyces cerivisiae*.

Nous envisageons dans un autre travail (PEYNAUD et S. LAFON-LAFOURCADE, 1968) l'application de cet appareil à la mesure de la limpidité des vins et à leur contrôle microbiologique.

PRINCIPE ET FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL

L'appareil permet de déterminer le nombre et la dimension des particules en suspension dans un liquide électriquement conducteur, donc d'une salinité suffisante, qui circule à travers une petite ouverture située entre deux électrodes immergées ; une tension continue réglable est appliquée entre ces électrodes.

Chaque passage de particule fait varier la résistance entre les électrodes et produit une impulsion proportionnelle au volume de la particule qui, après amplification, est mesurée et comptée par l'appareil électronique.

La méthode est rapide, de l'ordre de 30 secondes au maximum par comptage. Avec une concentration convenable des particules en suspension dans une solution électrolytique déterminée et une sonde d'ouverture bien choisie, on obtient une très bonne reproductibilité des mesures.

L'appareil (fig. 1) comporte essentiellement : deux électrodes de platine immergées dans la solu-

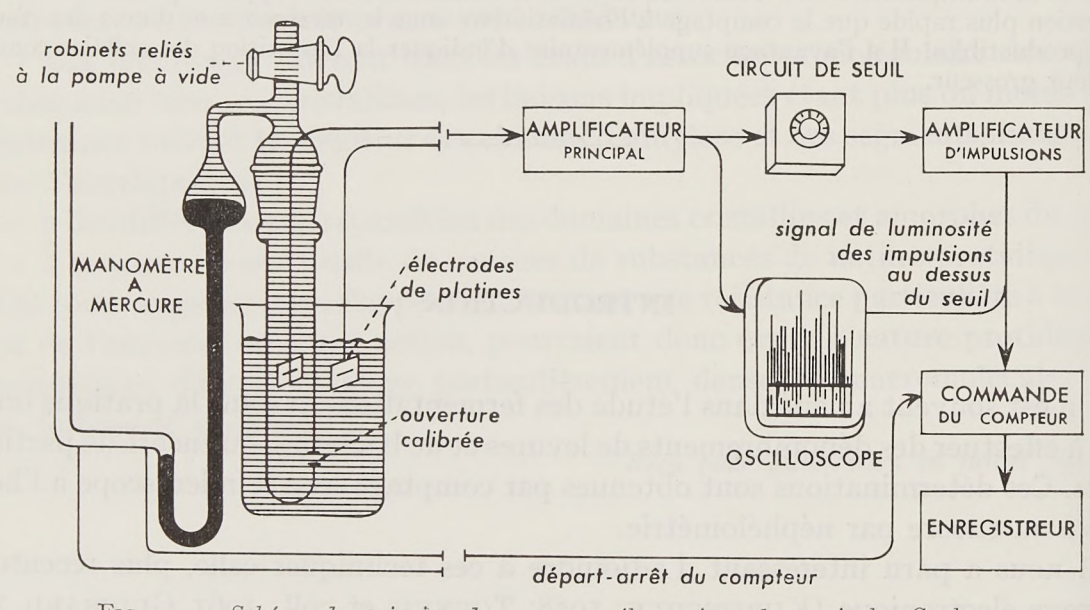


FIG. 1. — *Schéma du principe du compteur électronique de particules Coulter*

tion d'électrolyte à étudier et un tube de verre ou « sonde » percé d'une ouverture calibrée, à travers laquelle circule la solution au moyen d'une petite pompe à vide ; la sonde communique avec un manomètre à mercure qui provoque la circulation d'un volume déterminé de la solution (0,5 ml) lorsque le système est isolé du vide extérieur, au moment des comptages. L'ensemble est relié à un bloc électro-

nique dans lequel les impulsions de tension créées par le passage des particules à travers l'orifice calibré de la sonde sont amplifiées et envoyées sur un seuil à niveau variable. Les variations du niveau de seuil t' et de l'intensité du courant d'ouverture I permettent de déterminer la répartition des particules par volume. Un calcul simple, à partir du facteur d'étalonnage K de l'appareil obtenu au moyen de particules de diamètre connu, conduit au diamètre de sphères équivalentes.

$$d = K \sqrt[3]{t}$$

où t, qui sert de base à une échelle cohérente de volumes relatifs, est fonction de t' et de I.

Mode opératoire

Tous les essais relatés ici ont été réalisés avec une sonde à orifice de 70 μ de diamètre ; le volume de liquide soumis au comptage est de 0,5 ml. Le diamètre minimal des particules comptées a été de 2 μ ; il est inférieur aux dimensions normales des levures étudiées ici. Avec une sonde à orifice de 30 μ et en jouant sur la salinité de la solution on peut compter des particules de 0,6 μ et ainsi saisir les populations bactériennes. La solution électrolytique utilisée contient 1 p. 100 de chlorure de sodium. Elle doit être débarrassée des particules en suspension par filtration, soit sur une colonne spéciale en métal fritté, soit sur disques Millipore.

La teneur en particules de la solution d'électrolyte ne doit pas dépasser 1 p. 100 de celle de l'échantillon. La solution est d'abord soumise au comptage, puis on procède à l'étalonnage de l'appareil. La sonde est plongée dans 100 ml environ de la solution saline. On effectue une série de mesures en faisant varier la graduation de seuil t' et l'intensité du courant d'ouverture I, à partir de leurs valeurs les plus élevées. Dans chaque cas trois comptages successifs sont recommandés ; ils doivent donner les mêmes résultats à quelques p. 100 près ; on retient la valeur moyenne. Les résultats les plus fidèles sont obtenus pour des numérations allant de quelques milliers à 50 000 ; au delà, les corrections dites « de coïncidence », données par le constructeur pour tenir compte du passage simultané de plusieurs particules, deviennent trop importantes. Le diamètre moyen des levures que nous voulons ici étudier se situant autour de 4 à 5 μ, nous avons cherché à étaler les numérations dans une échelle de diamètre comprise entre 8 et 2 μ. La sensibilité de l'appareil est fonction de la résistivité de l'électrolyte et du diamètre de l'orifice de la sonde ; elle peut se trouver réduite par l'enregistrement d'impulsions parasites émises dans l'endroit où est installé l'appareil et qui faussent les résultats. Ces impulsions sont décelées à leur passage sur l'oscilloscope sous forme de trains de raies très irréguliers et se manifestent par une grande disparité des mesures successives pour un même échantillon.

Lorsque les numérations sont terminées dans la solution électrolytique, on prend à l'aide d'un voltmètre la tension aux bornes de l'ouverture : V. On ajoute ensuite quelques gouttes d'une suspension de grains de latex de diamètre connu : 2,05 μ par exemple. En faisant circuler la solution, on suit sur l'oscilloscope le passage des particules calibrées. Il suffit alors en jouant sur le seuil t' et sur l'intensité du courant d'ouverture I' d'effacer le spectre. On relève les valeurs t' I qui permettent d'étalonner l'appareil de la manière suivante :

On passe par calcul de la tension V à la résistance de l'ouverture R :

$$R = \frac{215\,000 \times V}{300}$$

R = résistance de l'ouverture
source de tension constante : 300 V
215 000 = résistance en série avec l'ouverture
V = tension mesurée dans l'ouverture.

Une table établie par le constructeur permet d'obtenir à partir de R et de I le facteur d'expansion d'échelle F. On en tire le facteur $t = t' F$ qui sert de base à une échelle cohérente de volumes relatifs. Le facteur d'étalonnage K est calculé suivant :

$$K = \frac{d}{\sqrt[3]{t}}$$

d étant connu : 2,50 μ pour des grains de latex.

Le facteur K reste valable tant que la tension aux bornes d'ouverture est identique, en particulier tant que la résistivité de la solution électrolytique est inchangée.

Après lavage avec la solution saline, la sonde est plongée à nouveau dans 100 ml d'une dilution convenable de l'échantillon dans la solution électrolytique. Une forte dilution est souvent nécessaire dans les milieux en fermentation jusqu'à 10^{-4}. Une forte agitation des suspensions à tous les stades des dilutions permet une bonne répartition des particules. Une dispersion à l'aide d'un générateur d'ultra-sons, plus efficace, est recommandée pour séparer les amas de levures.

L'échantillon est ensuite soumis à la numération. On donne successivement à l'appareil les mêmes

caractéristiques de seuil t' et de courant d'ouverture I que précédemment. Pour chaque réglage on effectue trois numérations, dont on retient la moyenne. Cette valeur moyenne doit être diminuée du nombre de particules dans la solution d'électrolyte au même réglage de l'appareil, c'est-à-dire de même diamètre, et augmentée de la correction « de coïncidence ».

Le diamètre des particules correspondant à chaque réglage t', I de l'appareil est donné par la formule :

$$d = K \sqrt[3]{t}$$

Nous obtenons ainsi le nombre de particules contenues dans 0,5 ml de suspension diluée, pour une série de diamètres connus. La concentration par ml de l'échantillon est obtenue en multipliant ce nombre par 2 et par le facteur de dilution.

EXEMPLE DE RÉSULTATS OBTENUS

Mode d'expression des résultats

Dans les tableaux 1 et 2 nous donnons des résultats expérimentaux obtenus dans l'étude d'une culture de *Schizosaccharomyces pombe* sur moût de raisin, 4 jours après l'ensemencement. Le tableau 1 rapporte les résultats bruts livrés par le compteur pour

TABLEAU 1

Exemple de numération sur une culture de levures. Résultats bruts.
Schizosaccharomyces pombe cultivé sur moût de raisin, après 4 jours

Diamètre d'ouverture : 70 μ ; Volume du manomètre : 0,5 ml
facteur d'étalonnage K = 4,05 ; résistance de l'ouverture : 17 000 Ω ;
indice de gain : 3 ; dilution 1/100

Numéro de la mesure	t′	I	Comptages bruts			Moyenne
			1	2	3	
1	90	4	187	184	145	*172*
2	70	4	414	411	393	*406*
3	70	5	6 270	6 600	5 820	*6 230*
4	60	5	10 389	9 960	10 484	*10 277*
5	40	5	22 768	23 891	23 156	*23 271*
6	30	5	35 852	35 223	35 526	*35 533*
7	25	5	40 911	40 456	40 963	*40 560*
8	20	5	45 103	44 380	45 426	*44 969*
9	20	6	46 699	46 287	46 433	*46 473*
10	20	7	48 549	47 306	47 652	*47 836*
11	20	8	48 541	48 247	48 610	*48 466*
12	15	8	47 511	48 988	49 325	*48 608*
13	20	9	50 749	50 320	50 860	*50 643*

divers réglages de sensibilité de l'appareil. Les deux premières colonnes correspondent au réglage de l'appareil suivant le niveau de seuil t' et l'intensité du courant d'ouverture I. Les trois autres colonnes reproduisent les trois répétitions de mesure et la dernière, leur moyenne arithmétique.

Le tableau 2 indique l'exploitation de ces résultats et les calculs permettant d'obtenir finalement les comptages des levures à différents diamètres. Dans les deux premières colonnes, on a calculé les corrections à apporter à la lecture puis la population moyenne corrigée. La quatrième colonne donne le diamètre des cellules correspondant à chaque étape de mesure calculée par application de la formule $d = K \sqrt[3]{t}$; la cinquième donne les comptages cumulatifs globaux rapportés au ml.

TABLEAU 2

Exemple de numération sur une culture de levures

Résultats après calculs
Exploitation des résultats bruts du tableau 1

Numéro de la mesure	Corrections		Moyenne corrigée	Diamètre calculé μ	Comptages cumulatifs (milliers/ml)
	Coïncidence	Solution de base			
1		2	170	9,1	*34*
2		1	405	8,3	*81*
3		5	6 225	6,6	*1 245*
4		9	10 268	6,3	*2 054*
5	500	14	23 727	5,5	*4 745*
6	1 000	43	36 490	5,1	*7 298*
7	1 300	43	41 817	4,7	*8 363*
8	1 700	43	46 626	4,4	*9 325*
9	1 700	56	48 117	3,5	*9 624*
10	2 000	110	49 726	2,8	*9 945*
11	2 000	150	50 316	2,3	*10 063*
12	2 000	214	52 394	2,1	*10 578*
13	2 300	256	52 697	2,0	*10 539*

Sous cette forme, ces dernières valeurs intéressantes en valeur absolue sont peu expressives au point de vue comparatif et difficiles à exploiter à cause de l'irrégularité de la progression de la grosseur des cellules. On distingue seulement que le nombre des grosses cellules de diamètre voisin de 8 à 9 μ est très faible, de même le nombre des cellules aux environs de 2,5 μ. Une représentation graphique des résultats se prête mieux aux comparaisons. C'est ce qui a été tenté dans les figures 2 et 3.

L'échelle logarithmique permet de représenter de grandes modifications de population, mais déforme l'histogramme en augmentant la sensibilité à la base pour les cellules les plus petites et les plus grosses et en aplatissant le sommet dans la zone où la sensibilité est plus faible.

La représentation graphique rend les résultats plus faciles à comparer, mais diminue la précision ; il ne peut donc être tenu compte de faibles différences de tracé dans les courbes et les histogrammes.

Étude de la croissance de diverses espèces de levures

Nous avons suivi à l'aide du compteur électronique la multiplication de différentes espèces de levures, choisies pour leurs grosseurs diverses, sur moût de raisin

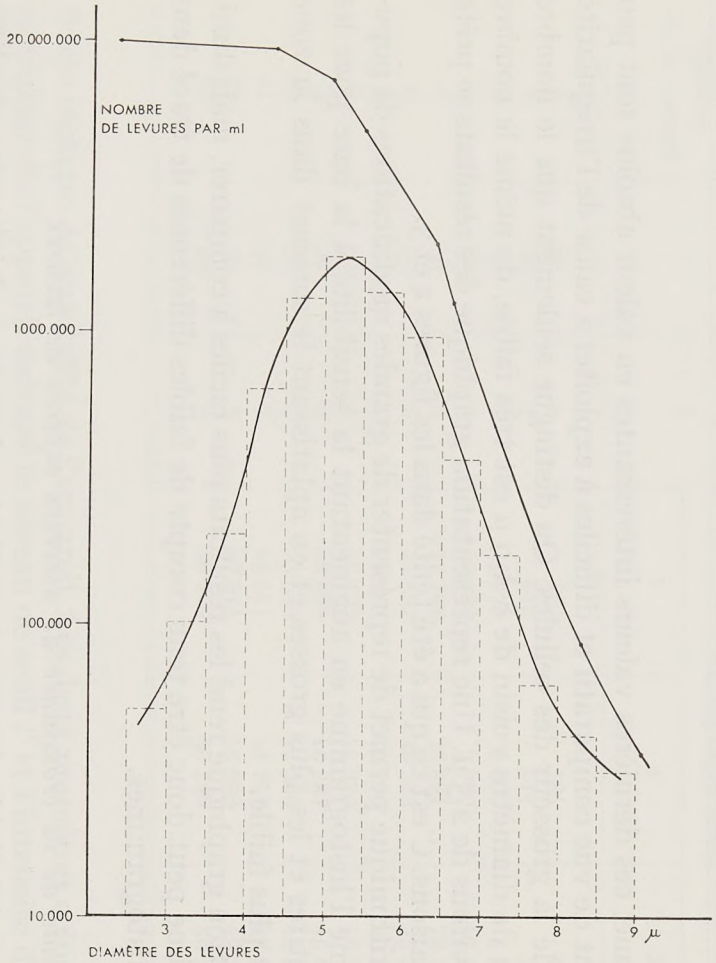


FIG. 2. — *Courbes de comptage cumulatif en fonction du diamètre des levures et histogramme des fréquences calculé à partir de ces courbes*

Échelle semi-logarithmique. Culture de *Schizosaccharomyces pombe* âgée de 4 jours, sur moût de raisin

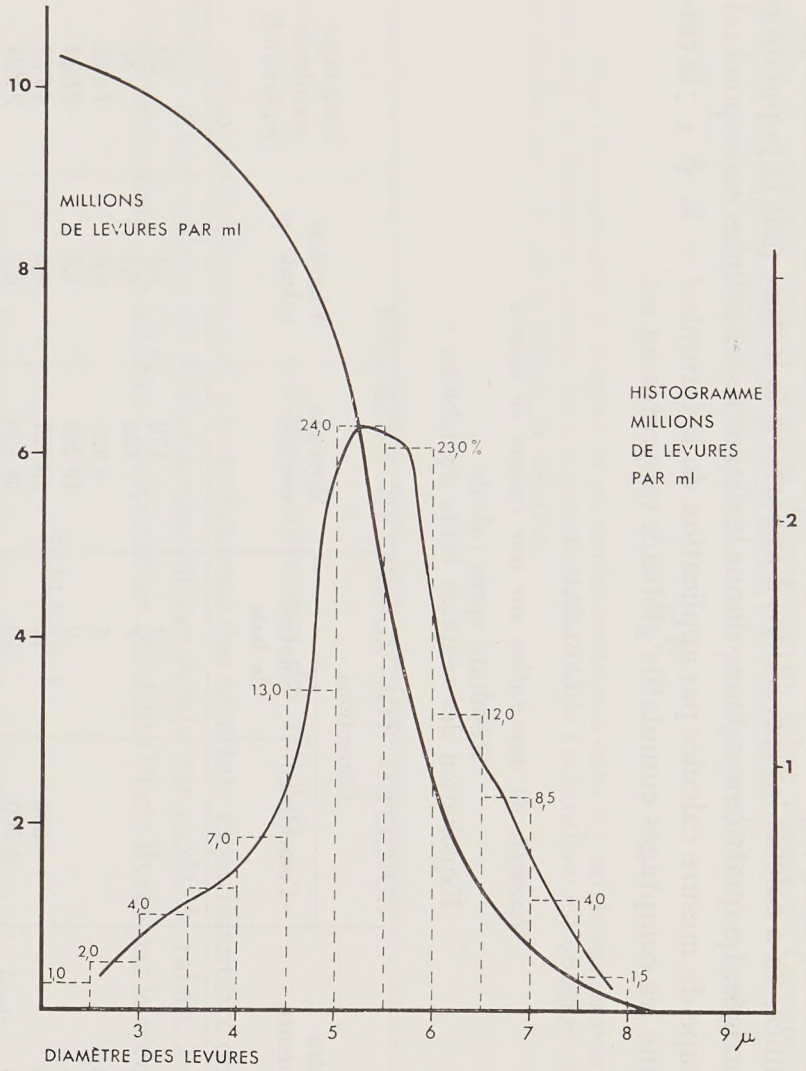


FIG. 3. — *Même cas que la figure 2. Échelle arithmétique,*

L'histogramme exprime également les pourcentages de fréquence

filtré. Les espèces suivantes ont été utilisées : *Kloeckera apiculata, Saccharomyces ellipsoideus, Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomycodes ludwigii*. Dans certains cas, on a comparé la multiplication en aérobiose ménagée et en anaérobiose. Des numérations au compte-globules Malassez étaient effectuées parallèlement.

Les tableaux 3 et 4 et la figure 4 reproduisent quelques exemples de ces résultats.

TABLEAU 3

Étude de la multiplication des levures

Fermentation d'un moût de raisin en aérobiose avec *Saccharomyces ellipsoideus*.
Les valeurs indiquent le nombre de levures par mm³
comptées à partir du diamètre considéré et pour les diamètres supérieurs

Diamètre des levures (μ)	Culture de 2 j	Culture de 3 j	Culture de 9 j	Culture de 15 j
7,6	632	880	4 390	1 600
6,0	833	10 220	25 940	8 440
4,8	19 490	44 580	54 330	40 580
4,4	23 320	54 000	59 910	53 450
3,9	25 908	61 320	71 740	60 290
3,1	23 045	64 960	73 440	67 280
2,5	25 379	76 120	85 710	77 140
2,0	29 455	89 820	85 970	81 430

TABLEAU 4

Répartition des levures suivant leur diamètre

Fermentation d'un moût de raisin avec diverses levures. Les valeurs indiquent le nombre de levures par mm³ comptées à partir du diamètre considéré et pour les diamètres supérieurs.
Exemple : 2e colonne, il y a 1 800 levures d'un diamètre de 4,8 μ et au-dessus

Diamètre des levures (μ)	*Kloeckera apiculata* anaérobiose (4 jours)	*Saccharomyces ellipsoideus* anaérobiose (4 jours)	*Saccharomyces ellipsoideus* aérobiose (4 jours)	*Saccharomycodes ludwigii* anaérobiose (4 jours)	*Saccharomycodes ludwigii* aérobiose (4 jours)
7,6	—	520	880	1 280	3 340
6,0	400	8 220	10 220	7 360	19 640
4,8	1 800	22 740	44 580	11 260	42 980
4,4	2 420	25 680	54 000	11 120	47 900
3,9	5 580	27 980	61 320	11 980	49 780
3,1	9 900	29 820	64 960	13 280	60 080
2,5	22 540	38 560	76 120	20 820	62 850
2,0	26 840	43 760	89 820	20 720	70 420
Numération au microscope	20 000	32 000	75 000	20 000	52 000

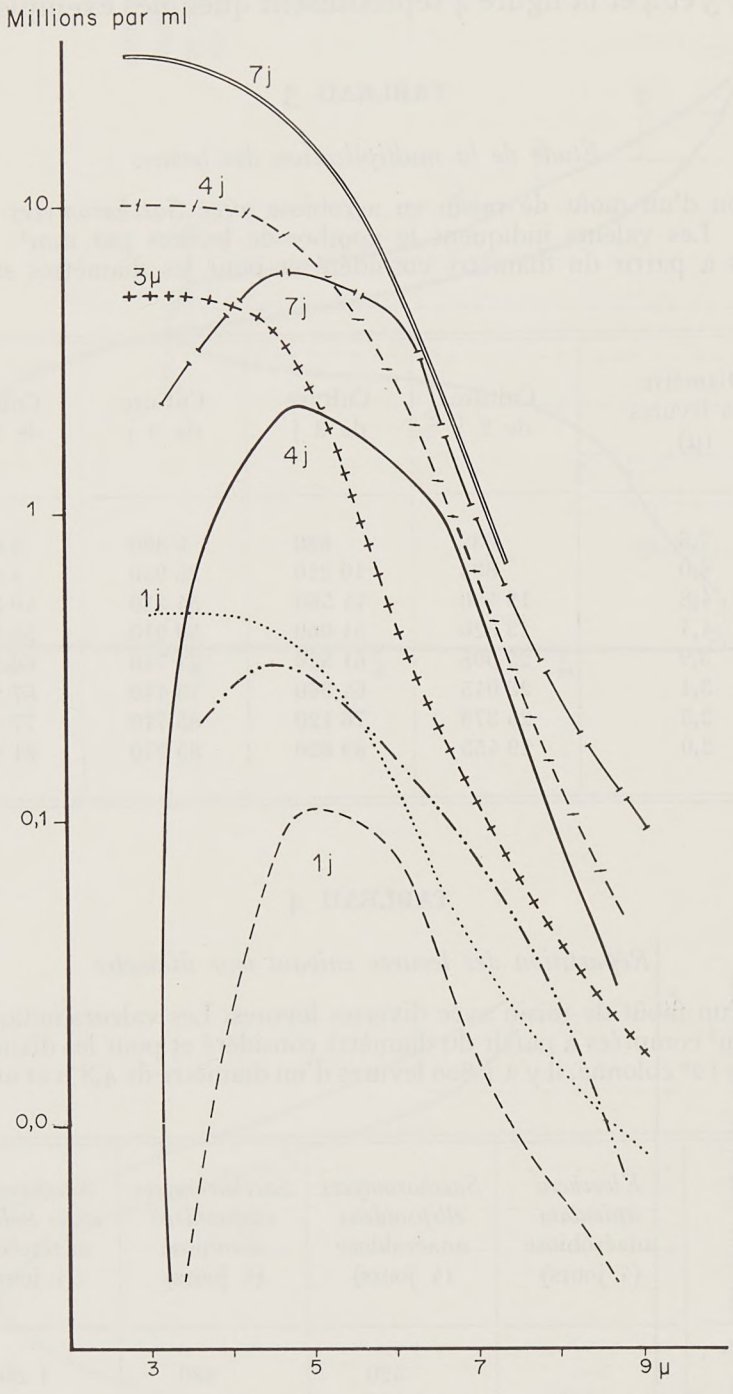


FIG. 4. — *Courbes de comptages cumulatifs et différentiels à différents moments d'une culture de* Schizosaccharomyces pombe

On retrouve les phénomènes observés déjà à l'hématimètre et bien connus ; la multiplication est rapide dans les premiers jours de fermentation, elle est considérablement accélérée par l'aération ; la population augmente tant qu'il y a du sucre à transformer ; dès que la fermentation est terminée la population diminue. Des quatre levures étudiées, c'est *Saccharomyces ellipsoideus* qui atteint les populations les plus élevées.

La dispersion des diamètres des levures d'une population est assez large. Les diamètres supérieurs à 7 où 8 μ peuvent correspondre à des levures agglomérées, les diamètres inférieurs à 3 à des petites cellules elliptiques en voie de croissance.

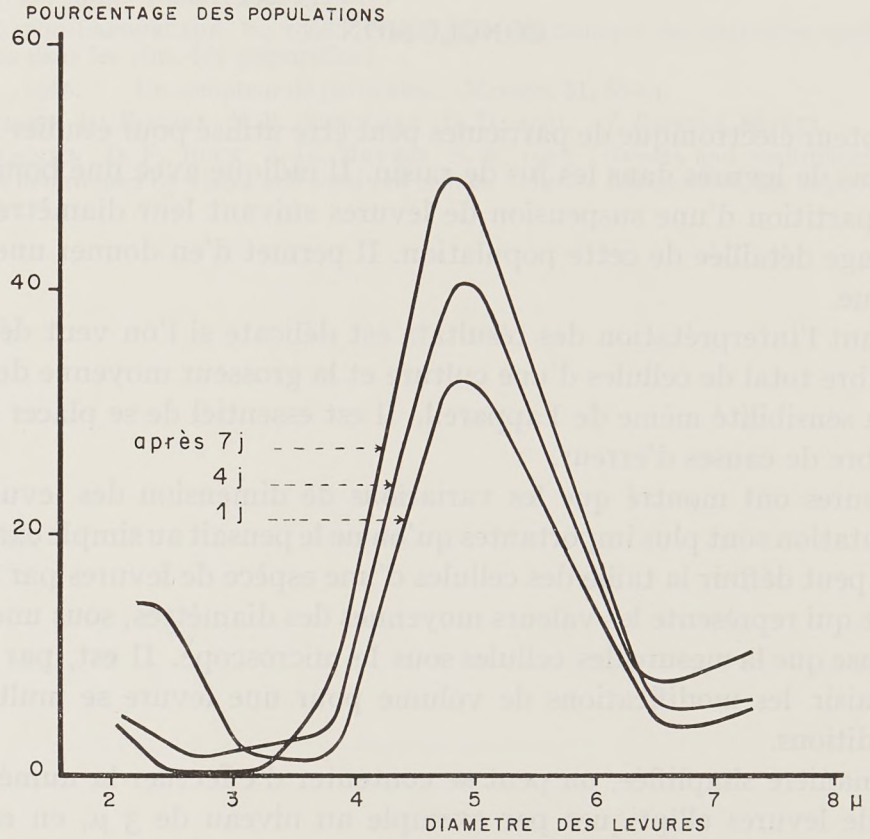


FIG. 5. — *Courbes de comptages différentiels en p. 100 de la population à différents moments d'une culture de* Schizosaccharomyces pombe

Les histogrammes en p. 100 de la population en fonction du diamètre des cellules montrent pour *Schizosaccharomyces pombe* par exemple que la plupart des cellules sont comprises entre un diamètre de 4,5 à 6,5 μ avec un maximum pour $d = 5$ μ. Ce pourcentage croît du 1er au 7e jour. Le nombre des levures de taille relativement faible est très important surtout le 1er jour : 30 p. 100 ; il est de 6 et 5 p. 100 respectivement les 4e et 7e jours ; c'est au 4e jour que le nombre de *Schizosaccharomyces* de diamètre supérieur à 6,6 μ est le plus élevé.

Les deux tiers des cellules sont comprises entre 2,5 et 4 μ pour *Saccharomyces ellipsoideus*, entre 4,5 et 7,5 μ pour *Saccharomycodes ludwigii*.

La concordance entre la numération visuelle sous le microscope et la numération électronique n'est pas toujours parfaite. L'ordre de grandeur seul est respecté. Il semble qu'à l'hématimètre l'opération ne tienne compte le plus souvent que des cellules ayant plus de 2,5 μ de diamètre. De plus il est probable que l'appareil électro-

nique et l'observateur au microscope interprètent différemment le cas des cellules en bourgeonnement ou des cellules restées agglomérées.

Les résultats ont surtout une valeur comparative lorsqu'on travaille exactement dans les mêmes conditions. Il convient de se placer à l'abri des causes d'erreurs surtout importantes pour les petits diamètres : présence de particules dans le milieu de culture, émission de parasites très courante dans les laboratoires ; enfin manque d'homogénéité des suspensions qui fausse les dilutions.

CONCLUSION

Le compteur électronique de particules peut être utilisé pour étudier la croissance de populations de levures dans les jus de raisin. Il indique avec une bonne reproductibilité la répartition d'une suspension de levures suivant leur diamètre et présente ainsi une image détaillée de cette population. Il permet d'en donner une représentation graphique.

Cependant l'interprétation des résultats est délicate si l'on veut définir simplement le nombre total de cellules d'une culture et la grosseur moyenne de ces cellules, à cause de la sensibilité même de l'appareil. Il est essentiel de se placer à l'abri d'un certain nombre de causes d'erreur.

Les mesures ont montré que les variations de dimension des levures au cours d'une fermentation sont plus importantes qu'on ne le pensait au simple examen microscopique. On peut définir la taille des cellules d'une espèce de levures par le tracé d'un histogramme qui représente les valeurs moyennes des diamètres, sous une forme donc plus rigoureuse que la mesure des cellules sous le microscope. Il est, par contre, plus difficile de saisir les modifications de volume pour une levure se multipliant dans diverses conditions.

D'une manière simplifiée, on peut se contenter d'effectuer la numération d'une population de levures elliptiques par exemple au niveau de 3 μ, en effectuant un réglage approprié de l'appareil.

Reçu pour publication en septembre 1968.

SUMMARY

USE OF A PARTICLE COUNTER FOR THE NUMERATION AND STUDY OF THE SIZE OF WINE YEASTS

This paper describes the application method, the advantages and the limits of a technique of numbering yeast cells in fermentation cultures by the use of an electronic particle counter.

This apparatus allows us to count precisely the number of cells in a culture and their distribution in terms of their diameter in satisfactory experimental conditions. Results thus obtained agree only relatively with visual microscopic numeration.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENDA J., WOLF E., 1965. Versuche einer Rassendifferenzierung bei *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Mitteilungen*, **15**, 300-316.

DEYSSON G., THI LAU N., 1963. Utilisation d'un compteur électronique de particules pour l'étude de la croissance de microorganismes : croissance et sporulation du *Saccharomycodes Gudwigii* HANSEN. *Ann. Pharm. Frwo.*, **21**, 275-285.

GUICHARD J.-C., 1965. Un appareil de mesure granulométrique : le compteur automatique Coulter. *Chim. anal.*, nº 3, 145-15..

KUBITSCHEK H. E., 1958. *Nature*, **182**, 234-235.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., 1968. Numération électronique des particules appliquée à l'étude des suspensions dans les vins. (en préparation).

PONTIGNY J.-A., 1966. Un compteur de particules. *Mesures*, **31**, 88-94.

TOENNIS G., ISZAED L., ROGERS N. B., SHOCKMAN G. D., 1961. *J. Bacteriol*, **82**, 857.

ZELLNER S. R., GUSTIN D. F., BUCK J. D., MEYERS S. P., 1963. Growth and multiplication of *Rhodotorula glutinis* as determined by viable and total cell counts. *Ant. v. Leeuwenhoek*, **29**, 203-210.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 253-255.

NOTE DE LABORATOIRE

DOSAGE DES PROTÉINES DANS LES PRÉPARATIONS CONTENANT DU SORBITOL

Émilienne BIZEAU, C. BIZEAU

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
École nationale supérieure agronomique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, 34 - Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

INTRODUCTION

Pour conserver les structures cellulaires au cours des broyages, préserver des protoplastes ou des organites subcellulaires, on utilise des protecteurs osmotiques. Le plus efficace et le plus fréquemment employé est le sorbitol.

Dans les préparations sans sorbitol, il est facile d'apprécier la quantité de matière vivante en dosant les protéines. Les deux méthodes les plus utilisées pour cela sont la méthode du biuret (STRICKLAOND. 1951), la méthode de LOWRY., (1951).

La première ne peut être utilisée en présence de sorbitol et donne des résultats par excès si on utilise des tampons à base de *Tris*.

Nous avons cherché à utiliser la seconde dans ces conditions.

Nous avons essayé également sur les mêmes échantillons des mesures directes de la quantité de protéines par spectrophotométrie en lumière ultra violette. Ceci conduit à une méthode approchée mais très simple qui peut être utilisée dans de nombreux cas.

I. — INFLUENCE DU SORBITOL SUR LA MÉTHODE DE LOWRY

La figure 1 A montre les spectres d'absorption du colorant obtenu par la méthode de LOWRY en présence et en absence de sorbitol. Les deux spectres sont identiques.

La figure 1 B montre l'influence de la concentration en sorbitol de l'échantillon sur la D.O. obtenue en présence de la même quantité de protéines. Comme on le voit la D.O. croît proportionnellement à la teneur en sorbitol, dans des limites cependant assez étroites.

La figure I C montre l'influence d'une dose de sorbitol sur des préparations contenant des quantités diverses de protéines. Ces préparations étant troubles, les lectures sont faites par rapport à un

témoin contenant toutes les solutions à l'exception de la solution E (réactif de Folin. Ciocalteu dilué).

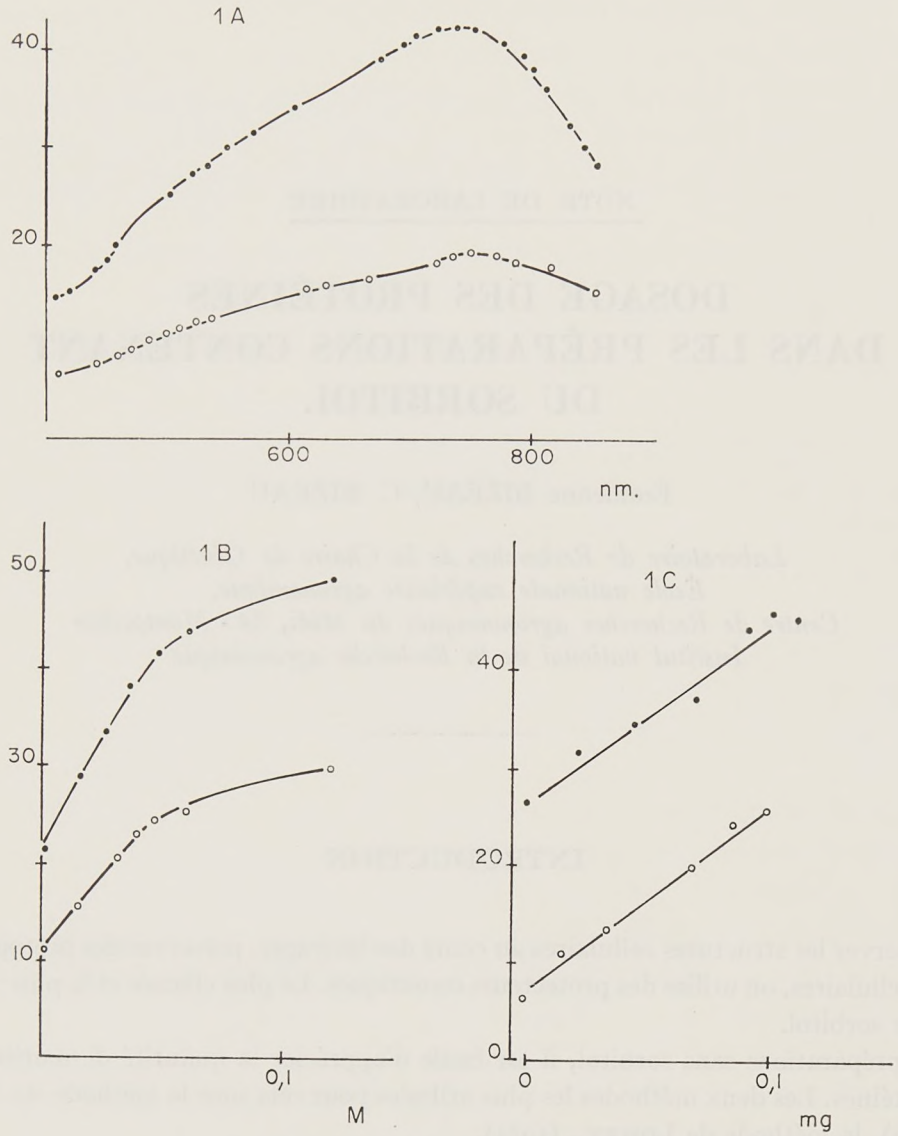


FIG. 1A.

Abscisse: λ *en nanomètres*
Ordonnée : *100* × *D.O. de la préparation contenant 80* μg *de B.S.A.*
○ D.O. sans sorbitol
● D.O. avec sorbitol

FIG. 1 B.

Ordonnée : *100* × *D. O. de la préparation*
Abscisse : *concentration en Sorbitol.*
○ D.O. à 500 nm
● D.O. à 750 nm
Les échantillons contiennent 80 μg de B.S.A.

FIG. 1 C.

Abscisse : *teneur en protéines exprimée en* mg *de B.S.A. dans la prise*
Ordonnée : *100* × *D.O. de la préparation*
○ D.O. en absence de sorbitol
● D.O. en présence de sorbitol 36 mM
lecture à 750 nm

Toutes les D.O. sont augmentées de la même quantité proportionnelle à la dose de sorbitol. On peut donc en présence de concentrations variables en sorbitol mesurer les protéines d'un échantillon à condition d'apporter un facteur correctif à la mesure.

II. — MÉTHODE RAPIDE ET APPROCHÉE PAR LECTURE DIRECTE A 280 NM

0,5 ml d'échantillon sont ajoutés à 3,5 ml de tampon phosphate M/15, pH 4,5, additionné de 0,75 ml de soude 20 p. 100 et porté au bain-marie bouillant 5 minutes exactement. On refroidit rapidement dans la glace et on complète à 5 ml. La lecture à 280 nm est faite soit sur cet échantillon, soit sur une dilution. La correction pour le trouble est faite selon LEGGET et BAILEY (1962).

Cette méthode simple n'est pas rigoureuse dans son principe puisqu'on l'utilise sur un milieu complexe contenant des substances non protéiques pouvant présenter une absorption forte à 280 nm, en particulier des acides nucléiques.

La correspondance entre les quantités de protéines présentes dans le milieu et la D.O. à 280 nm varie donc en fonction de la nature de l'échantillon et éventuellement de son mode de préparation. La méthode ne peut donc être utilisée qu'avec un étalonnage correspondant à chaque dispositif expérimental. Le sorbitol n'a évidemment aucune influence sur les résultats. Dans ces conditions cette méthode donne des résultats comparables à ceux donnés par la méthode de LOWRY mais elle est moins fidèle.

CONCLUSION

La méthode de LOWRY de dosage des protéines appliquée aux broyats, protoplastes, suspensions mitochondriales, etc., ne peut être utilisée sans précaution en présence de sorbitol.

La méthode de dosage par mesure de la D.O. à 280 nm est applicable dans ce cas à condition de faire préalablement un étalonnage très soigneux.

Reçu pour publication en juillet 1968.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LEGGET., BAILEY., 1962. Méthode de mesure de colorimétrie en milieu trouble. *Technics in protein chemistry. Elzevier.*

LOWRY., *al.*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. biol. Chem.*, **193**, 265.

STRIKLAND., 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microb* **5**, 698.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (3), 257-260.

NOTE

ÉTUDE DES DIFFÉRENTES COULEURS DE BAIES CHEZ LA VIGNE *(VITIS VINIFERA)*

D. BOUBALS, P. TRUEL, M. BOURZEIX, V. KOVAC (1) et T. GIOSANU (2)

Station de Recherches viticoles,
École nationale supérieure agronomique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, 34 - Montpellier
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

Les ampélographes distinguent, au moment de la pleine maturité des grappes, plusieurs types de coloration de la pellicule des baies qui sont les suivants :

— couleur « noire » (ex. : *Pinot noir, Carignan noir, Grenache noir*),

— couleur « noir rougeâtre » ou « rouge foncé » (ex. : *Cardinal*),

— couleur « rouge » (ex. : *Molinera*),

— couleur « rose » (ex. : *Sabalkanskoï, Chasselas rose*),

— couleur « grise » (ex. : *Pinot gris, Carignan gris, Grenache gris, Terret gris*).

— couleur « blanche » (ex. : *Chasselas, Carignan blanc*) ; certaines variétés à baies « blanches » ont la pellicule qui tend à devenir de couleur rose lorsque les grappes sont bien mûres (*Admirable de Courtiller, Ugni blanc*).

De plus, les ampélographes distinguent également si la pulpe des baies est ou non colorée (caractère teinturier), c'est-à-dire si le jus exprimé d'une baie par légère pression est incolore ou rouge.

La bibliographie comporte des résultats d'analyses des pigments anthocyaniques ayant eu pour but de caractériser chimiquement les matières colorantes de la pellicule des baies de variétés diversement teintées (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Cependant, à notre connaissance, dans aucun cas on n'est parvenu à préciser les composants auxquels sont dus les différents types de coloration de la pellicule des baies qu'on rencontre chez *Vitis vinifera*.

C'est d'ailleurs dans le but d'arriver à une interprétation rationnelle des résultats de transmission héréditaire de la couleur des baies chez la Vigne, qu'a été réalisée la présente étude des anthocyanes et des flavonols chez vingt-six variétés de cuve et de table représentant à peu près les différents types de coloration de la pellicule et de la pulpe trouvés dans l'espèce *Vitis vinifera*.

Ces variétés sont les suivantes :

— variétés à baies « noires » : *Pinot, Pinot teinturier, Carignan, Grenache, Terret, Fusca* (*142 Pirovano*), *Alicante Bouschet, Abouriou, Négrette* ;

— variétés à baies « noir rougeâtre » ou « rouges » : *Cardinal, Molinera, Muscat rouge* à petits grains;

(1) Institut de Recherches viticoles et arboricoles de Sremski-Karlovci (Yougoslavie).
(2) Section d'Œnologie, Station expérimentale Argès de Stephanesti, Pitesti (Roumanie).

— variétés à baies « roses » : *Chasselas violet, Chasselas rose, Muscat rose* à petits grains, *Sabalkanskoï*;
— variétés à baies « grises » : *Pinot, Terret, Carignan, Grenache*;
— variétés à baies « blanches » : *Chasselas, Pinot, Carignan, Grenache, Muscat blanc* à petits grains, *Admirable.*

On remarquera que diverses colorations ont pu être comparées chez une même variété : noir et gris chez *Pinot, Carignan, Grenache* et *Terret* ; rouge et rose chez le *Muscat* à petits grains.

La méthode utilisée pour le dosage des flavonols a été mise au point à Narbonne en 1966-1967 (7,8).

Pour l'isolement et le dosage individuels des anthocyanes on a utilisé une méthode, également mise au point à Narbonne (Bourzeix, Kovac, Giosanu, 1967) qui fera l'objet, sous une forme légèrement modifiée, d'une publication prochaine.

A cause de cette modification, indiquons sommairement qu'au cours du présent travail, l'isolement individuel a été obtenu par chromatographie bidimensionnelle directe, sur couches minces (0,5 mm) de cellulose (*Machery und Nagel N. N. 300*), lavée préalablement sur plaque (20 cm × 20 cm) par un développement « à blanc » par le mélange de méthyl-éthyl-cétone, d'acétone, d'eau et d'acide formique (60 v., 20 v., 20 v., 2 v.). A la suite du double développement dans la première direction, par le mélange d'alcool amylique, d'acide acétique et d'eau (2 v. 1 v., 1 v.) on fait, aussitôt après séchage, un dosage densitométrique (densitomètre enregistreur « Chromoscan » de marque Joyce, Londres). L'acide acétique à 50 p. 100 dans l'eau est utilisé pour le développement dans la direction perpendiculaire. Ce dernier développement exige une humidification de la couche. Pour cela, une heure avant, on met les plaques dans l'enceinte chromatographique contenant des petits béchers remplis d'eau à 60°C. On laisse ces béchers en place pendant le développement. S'il arrive que ce dernier développement dédouble une tache, un passage au densitomètre selon l'axe des deux taches finales donne les pics correspondants.

En rapportant la surface d'un pic à la surface totale des pics on a le pourcentage de l'anthocyane correspondante (mol.g./l)

Outre l'isolement individuel de chaque anthocyane permettant son dosage, on obtient par cette méthode un regroupement des taches par familles d'anthocyanes (monoglucosides, aglucones,...) qui facilite beaucoup l'identification. La reproduction ci-dessous (fig. 1) est celle de la répartition de toutes les anthocyanes rencontrées dans les cépages de *Vitis vinifera* étudiés dans le cadre de cette note. Naturellement un cépage donné ne possède qu'un certain nombre de pigments parmi ces anthocyanes.

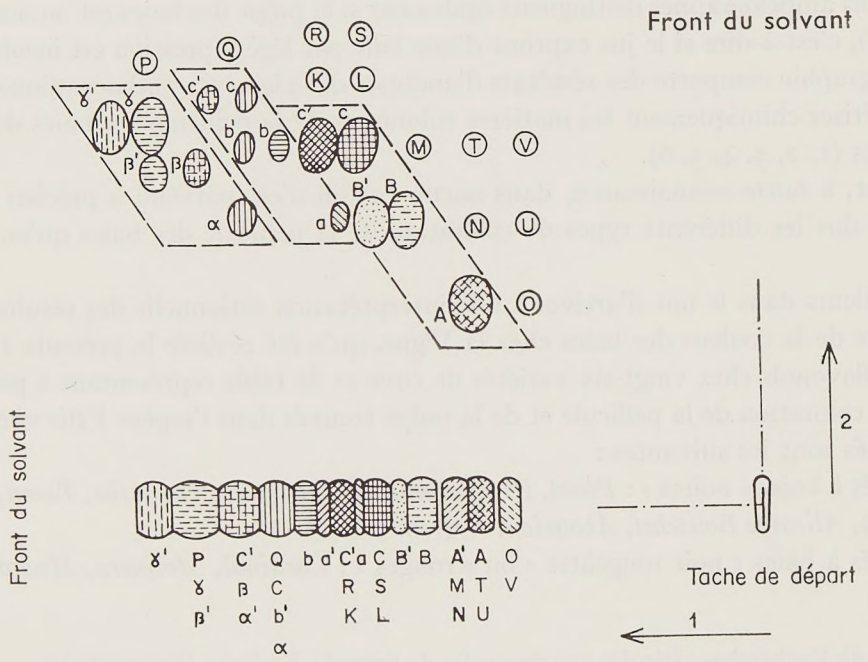


Fig. 1.

Les résultats ont été exprimés en pourcentages de mol.g. des diverses anthocyanes par rapport à la quantité totale de mol.g. de ces composés dans 100 grammes de baies ; pour les flavonols on évalue en mol.g. de rutine par 100 grammes de baies.

De l'examen des résultats obtenus il ressort la série de conclusions suivantes :

a) *la teinte des baies dépend de la nature des anthocyanes de la pellicule et des proportions respectives de ces pigments.*

La technique de séparation des anthocyanes employée a fait apparaître qu'il existait au moins deux types de pigments que l'on peut distinguer d'après la couleur qu'ils présentent sur les couches minces de cellulose, après leur développement et leur séchage. En effet, si tous ces pigments sont rouges lorsqu'on est en milieu acétique saturé, certains d'entre eux deviennent bleutés lorsque l'excès d'acide acétique s'est évaporé, tandis que d'autres restent rouges. Certes, il n'est pas possible de parler de pH à propos d'un milieu solide. On peut cependant avoir une indication sur l'acidité en incorporant à la couche humide des papiers indicateurs de pH, aussitôt après le dernier développement. Les colorants indicateurs diffusent dans la poudre de cellulose : aussitôt après séchage leurs teintes correspondent à pH 3,5 (toutes les anthocyanes sont rouges), puis ces teintes évoluent jusqu'à correspondre avec pH 6,0 (certaines anthocyanes virent alors au bleu).

De la comparaison des résultats analytiques obtenus sur les vingt et une variétés à pellicule colorée il apparaît que :

1° les pigments « virant au bleuté » sont certainement ceux qui déterminent les couleurs dites « noire » et « grise » de la pellicule des baies. Du point de vue chimique ces pigments paraissent être principalement des monoglucosides et des aglucones du *delphinidol*, du *petunidol* et du *malvidol*, les dérivés du *malvidol* étant quantitativement les plus importants.

C'est lorsque dans la pellicule de la baie il y a une proportion importante (≠ 70 p. 100) de pigments dits « bleutés » (dérivés du *delphinidol*, du *petunidol* et du *malvidol*) que la coloration de cette pellicule correspond aux types « noir » et « gris » déterminés visuellement (ex. *Carignan*, *Pinot*, *Grenache*, *Terret*, etc.).

Pour une variété déterminée de ces types il y a les mêmes anthocyanes, et en proportions (pourcentages) voisines, dans la forme à baies grises et dans la forme à baies noires. On observe seulement que, selon la variété, les baies « grises » ont des quantités d'anthocyanes cinq à neuf fois plus faibles (pour 100 grammes de baies) que les baies « noires ».

2° Les pigments « restant rouges » quelle que soit l'acidité (dans les limites correspondant aux teintes d'indicateurs colorés prises aux pH de 3,5 à 6), déterminent certainement les couleurs « rose » et « rouge » des pellicules des baies. Du point de vue chimique ces pigments paraissent être principalement des monoglucosides et des aglucones du *cyanidol* et du *paeonidol*, les dérivés du *cyanidol* étant les plus importants.

La coloration *rose* de la pellicule (ex. : *Sabalkanskoï*, *Chasselas violet*, *Chasselas rose*, *Muscat rose* à petits grains) correspond à une nette dominance (≠ 70 p. 100) des pigments « rouges » et en particulier de l'anthocyane située à l'emplacement du monoglucoside du *cyanidol* qui représente plus de la moitié du total des anthocyanes.

Lorsqu'il y a tendance vers l'égalité de proportions entre pigments « bleutés » et pigments « rouges » (situés aux emplacements des dérivés du *cyanidol* et du *paeonidol*), on observe une teinte rouge de la pellicule (ex. : *Molinera*). Dans ce cas, parmi les pigments « rouges », les dérivés du *paeonidol* se trouvent en plus grande quantité que ceux du *cyanidol*.

Enfin, la coloration légèrement rose, apparaissant dans la pellicule de certains cépages blancs comme l'*Admirable de Courtiller*, lorsque la maturation est très avancée, est déterminée par les pigments dits « rouges » (qui paraissent être les monoglucosides du *cyanidol* et du *paeonidol*).

b) *Le nombre des anthocyanes est très variable.*

— Il se situe entre 3 et 18.
— Les raisins *roses* en ont le moins (ex. : 3 chez *Sabalkanskoï*, 6 chez *Chasselas rose*).

— Les raisins *rouges* en ont généralement un grand nombre (ex. : 13 chez *Fusca* ; 18 chez *Cardinal*) ; de même les raisins *noirs* et les *gris* (ex. : 16 chez *Carignan*).

— Les pulpes des raisins noirs teinturiers examinés contiennent un nombre d'anthocyanes beaucoup plus faible que les pellicules correspondantes (4 contre 11 chez *Pinot teinturier* ; 5 contre 11 chez *Alicante Bouschet*).

c) *Chez les cépages teinturiers comme le* Pinot teinturier *et* l'Alicante Bouschet *la coloration de la pulpe est due à des anthocyanes de nature différente de celles de la pellicule.*

En effet, ce sont les pigments dits « rouges », surtout les dérivés du *paeonidol*, qui dominent, contrairement à la pellicule où les pigments dits « bleutés » sont les plus importants.

De plus, chez les *teinturiers*, pour un poids donné de baies il y a une quantité bien moindre de pigments dans la pulpe que dans la pellicule (quinze fois moins chez le *Pinot* et cinq fois moins chez l'*Alicante Bouschet*).

d) *Les variétés à baies dites blanches ne renferment pas d'anthocyanes dans la pellicule, sauf pour certaines d'entre elles lorsqu'on tend vers la surmaturation* (Admirable de Courtiller).

Il est à remarquer que les variétés blanches ne renferment généralement pas plus de *flavonols* que les variétés colorées (« noires », « grises », « rouges » et « roses »).

Reçu pour publication en avril 1968.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RANKINE B. C., KEPNER R. E., WEBB A. D., 1958. Comparison of anthocyan pigments of *Vinifera* grapes. *Amer. J. Enol.*, **9**, 105-110.

ALBACH F., KEPNER R. E., WEBB A. D., 1959. Comparison of anthocyan pigments of red *Vinifera* grapes. *Amer. J. Enol.*, **10**, 164-172.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959. *Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre* Vitis. Librairie générale de l'Enseignement, Paris.

WEAVER R. J., MCCUNE S. B., 1960. Influence of light on color developement in *Vitis vinifera* grapes. *Amer. J. Enol.*, **11**, 179-184.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6** (2). 119-147, (3), 211-242.

GETOV G., 1966. Studies on the composition of the anthocyanins in the grapes of red vine varieties. *Grad. Lozar. Nanka.*, **3**, (5), 37-545.

BOURZEIX M., BANIOL P., 1966. L'isolement des flavonols du vin par chromatographie sur couche mince de cellulose. *Ann. Technol. agric.*, **15** (2), 211-217.

BOURZEIX M., 1967. Le dosage des flavonols du vin. *Ann. Technol. agric.*, **16** (4), 349-355.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulet. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, tableaux, les légendes des figures et graphiques. etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviation ni ormules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les mes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, pré- de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effecs les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
mmaire : résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son impore ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière lus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une yse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *Références iographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en franmais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures hiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval,). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : . A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les artciles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de paru- de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en çais dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étrana sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signaletique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de rrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphaatin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; remière et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage ntier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera, en plus, le nom de l'auteur du itre cité, les noms des rédacteurs principaux, précédés de la mention « in ».

La mention de « communication personnelle » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parens. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la ence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures nt faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la teur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de ngueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront s que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas pée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.
Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et r les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* 5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préfé- en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera rmes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra r un numéro en chiffre arabe visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros igures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une seule épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne nce), ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy - en - Josas. oyer deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le Directeur de la publication : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 12-1968.

Dépôt légal : 4e trimestre 1968. N° d'impression : 2917.

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 17 1968 NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique,
à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 267-276.

LES PROTÉINES SOLUBLES DU BLÉ

II. — Fractionnement des albumines par chromatographie sur DEAE-cellulose et par électrophorèse préparative : isolement d'une protéine électrophorétiquement homogène (1)

P. FEILLET, A. BOURDET

avec la collaboration technique de Danièle Berger, Ginette Gobin, Francine Guillemot

Laboratoire d'Études et de Contrôle de la Qualité des Blés français,
16, rue Nicolas-Fortin, 75 - Paris (13e)
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Le fractionnement des albumines du blé par chromatographie sur DEAE-cellulose, suivi d'une purification par électrophorèse préparative sur colonne de gel de polyacrylamide, a permis d'isoler une protéine du blé (*Alb. 13*), homogène en électrophorèse en gel d'amidon à pH = 8,9 (tampon *Tris*). Des préparations, très enrichies en d'autres fractions, ont également été isolées au cours de ces opérations. On a montré, par ailleurs, que les albumines du blé ne pouvaient pas être identifiées par leur comportement électrophorétique en milieu acide, des fractions différenciées en tampon *TRIS* possédant une mobilité équivalente à pH = 3,2.

INTRODUCTION

Très hétérogènes, les protéines solubles du blé ont été l'objet ces dernières années, de plusieurs tentatives de fractionnement (Feillet, 1967) : sur DEAE-cellulose, Simmonds (1963) sépare un extrait salin de farine en 8 pics dont certains, homogènes en électrophorèse en veine liquide après rechromatographie, apparaissent très complexes en électrophorèse en gel d'amidon (Graham, 1963) ; Nimmo et *al.* (1963) isolent 11 constituants par chromatographie d'un extrait aqueux sur le même échangeur mais les fractions obtenues demeurent hétérogènes en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Grabar et *al.* (1962) préparent deux fractions « presque pures » en immunoélectrophorèse, la simplicité du fractionnement retenu permettant

(1) La première artie de ce travail a paru dans le n° 3/1968 des Annales de Technologie agricole.

cependant de penser que les protéines isolées se révéleraient polydispersées par d'autres techniques. Plus récemment, on peut noter le travail de KELLEY (1964) qui semble être le premier à avoir préparé une fraction purifiée (1) en quantité suffisante pour en faire l'analyse physico-chimique, ainsi que ceux de TIPPLES et TKACHUK (1965), TKACHUK et TIPPLES (1966) et REXOVA et *al.* (1967) sur l'isolement des beta-amylases par chromatographie sur DEAE-cellulose. Signalons enfin le fractionnement sur CM-cellulose et DEAE-cellulose des protéines solubles proposé par CLAYTON (1966), aucun test n'ayant été malheureusement retenu pour préciser l'homogénéité des fractions isolées.

Poursuivant notre étude sur les protéines solubles du blé (FEILLET et BOURDET, 1968), et en raison de l'absence presque totale de renseignements sur les propriétés des constituants des albumines, nous avons recherché de nouvelles conditions de fractionnement permettant d'isoler des entités protéiques individualisées afin d'en préciser par la suite les caractéristiques.

L'homogénéité des fractions isolées a été contrôlée, au cours de ce travail, par leur comportement électrophorétique en gel d'amidon en milieu acide et basique. Tout en sachant bien les critiques que l'on peut faire à une définition de pureté basée sur un seul critère (2), nous avons retenu ce test pour les raisons suivantes : très grand pouvoir de résolution de la technique, risques d'erreur plus faibles en opérant à 2 pH, simplicité et rapidité de la méthode, poids de matériel protéique nécessaire de l'ordre du milligramme.

MATÉRIEL D'ÉTUDE ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1. *Matériel d'étude*

L'albumine ALB. A, préparée dans les conditions déjà décrites (FEILLET et BOURDET, 1968) par relargage au sulfate d'ammonium (2 M) d'un extrait salin de farine de blé *Cappelle*, a servi de matériel de base à cette étude. Entièrement soluble dans l'eau, sa teneur en azote est de 13,8 p. 100 s.s.

2. *Méthodes expérimentales*

a) *Chromatographie sur DEAE-cellulose*

On a réalisé deux types de fractionnement : DEAE-1 et DEAE-2. Les tampons utilisés, dont certains sont communs aux deux systèmes, sont les suivants :

Tampon A : 24 mg BO_3H_3, 29 mg KCl, 382 mg Na_2CO_3, H_2O q. s. p. 1 000 ml, pH = 10,4.
Tampon B : 2,32 g NaCl, tampon A, q. s. p. 1 000 ml, pH = 10,35.
Tampon C : 484 mg BO_3H_3, 584 mg KCl, 1,2 g NaCl, H_2O q. s. p. 1 000 ml, pH = 5,4.
Tampon D : 340 mg PO_4H_2K, 840 mg PO_4 HNa_2, 12 H_2O 5,4 g NaCl, H_2O q. s. p. 1 000 ml, pH = 6,8.
Tampon E : 112 g NaCl, Tampon D q. s. p. 1 000 ml, pH = 5,9.
Tampon F : 50 mg PO_4H_2K, 1 200 mg PO_4HNa_2, 12 H_2O H_2O q. s. p. 1000 ml, pH = 7,8.

Système DEAE-1.

30 g de DEAE-cellulose (SERVA) sont mis en suspension dans 1 500 ml de tampon F concentré (100 fois). Après homogénéisation et repos d'une heure, on élimine les fines particules en suspension dans le tampon par décantation. On remet l'échangeur en suspension dans 400 ml de tampon F

(1) Pure à 96 p. 100 d'après son comportement en électrophorèse de Tiselius.

(2) La pureté des préparations électrophorétiquement homogènes sera contrôlée par d'autres critères dans la suite de ce travail.

avant de le verser dans une colonne de diamètre ⌀ = 3 cm. Après sédimentation de l'échangeur (hauteur de colonne h = 20 cm), on lave abondamment celui-ci par percolation du tampon F (1000 ml ; débit régularisé par une micropompe : 150 ml/h).

On dépose alors par décantation au sommet de la colonne 1 g d'Albumine ALB. A dissoute dans 100 ml de tampon F.

On recueille 2 pics non fixés (lavage de la colonne par le tampon F), puis 3 autres élués par le tampon D.

Les éluats sont récupérés par fraction de 25 ml (150 ml à l'heure).

Système DEAE-2.

7,5 g de DEAE-cellulose sont mis en suspension dans le tampon A concentré (100 fois) puis équilibré, comme ci-dessus, dans le tampon A. On utilise une colonne de diamètre ⌀ = 2 cm ; la hauteur d'échangeur dans la colonne est h = 10 cm. On peut déposer jusqu'à 500 mg de protéines dissoutes dans 10 ml de tampon A.

L'élution est réalisée de la manière suivante : on fait passer le tampon A (300 ml), puis le tampon B (300 ml) puis un gradient salin et de pH obtenu en faisant arriver le tampon C dans 200 ml de tampon B lui-même branché sur le sommet de la colonne (dispositif à récipients superposés), puis le tampon D (375 ml) et enfin le tampon E (150 ml). Les éluats sont recueillis par fractions de 15 ml à raison de 10 tubes à l'heure.

Les pics isolés sont dialysés puis lyophilisés (après précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ 3 M dans le système DEAE-1).

b) *Électrophorèse préparative.*

Le dispositif expérimental, schématisé figure 1, est constitué d'une simple colonne de verre dont le tiers inférieur, légèrement tronconique, peut recevoir un sac de dialyse amovible.

La séparation est réalisée en milieu basique sur gel de polyacrylamide dans les conditions déjà décrites (Feillet et Bourdet, 1967 *a*).

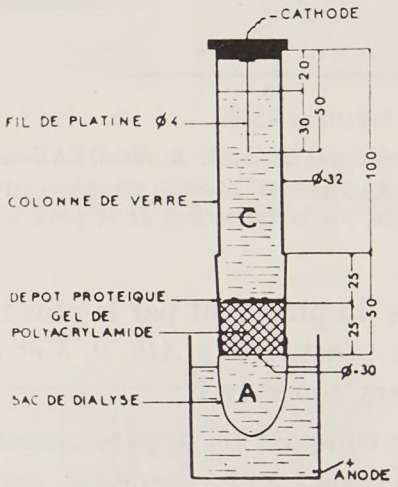


Fig. 1. — *Dispositif expérimental d'électrophorèse préparative*

c) *Autres techniques expérimentales.*

La concentration en protéine des éluats de colonne est déterminée par spectrophotométrie à 280 mμ.

L'électrophorèse en gel d'amidon est effectué en tampon lactate (pH = 3,2) ou *Tris* (pH = 8,9) (Feillet, 1965). Les fractions constitutives des albumines sont numérotées de *1* à *21* ou notées de *a* à *l* suivant leur mobilité en milieu basique ou acide (Feillet et Bourdet, 1968).

RÉSULTATS

1. *Chromatographie de ALB. A sur DEAE-cellulose* (Système 1)

La figure 2 illustre le fractionnement réalisé.

Les 5 pics isolés (2 non fixés sur la colonne et 3 élués par le tampon D) demeurent très hétérogènes :

— le pic *a* (DEAE-*1 a*) possède la totalité des protéines basiques (*Alb. 15* à *Alb. 21*) excepté la fraction *19* absente de l'albumine ALB. A de départ ; les albumines *14*, *13* et *12* y sont également particulièrement visibles, les protéines plus électro-négatives (*Alb. 1* à *Alb. 11*) étant presque totalement éliminées. On note également la présence d'une fraction de mobilité pratiquement nulle, très légèrement électro-positive ;

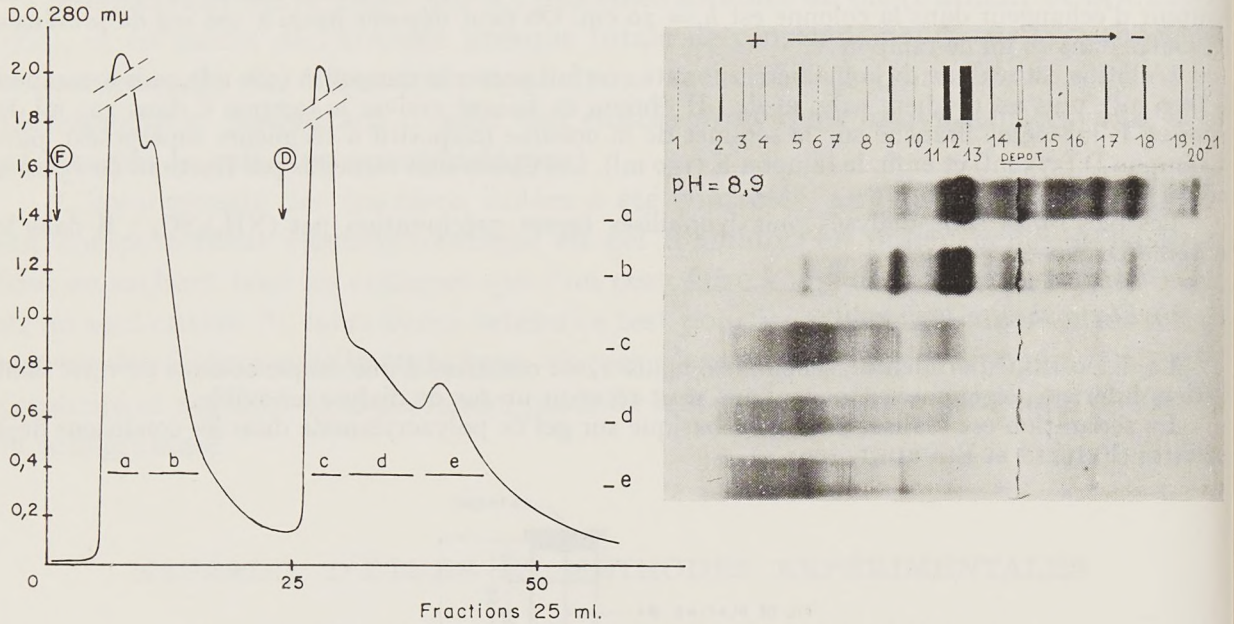


FIG. 2. — *Fractionnement de* ALB. A *sur* DEAE-cellulose (système 1).
Colonne équilibrée en tampon phosphate pH = 7,8 ;
élution par accroissement de la force ionique

— le pic *b* se différencie du précédent par la plus faible proportion de protéines basiques et l'apparition des constituants *Alb. 9*, *8* et *5* à plus forte concentration ; l'*Alb. 9* y est particulièrement concentrée ;

— les pics *c*, *d* et *e*, de composition apparemment voisine, sont constitués des protéines les plus acides ; ils possèdent cependant encore des traces de l'*Alb. 11* (ou d'une fraction de même mobilité) qui semble donc en partie associée aux albumines les plus électro-négatives.

2. *Chromatographie des albumines ALB. A sur DEAE-cellulose* (Système 2)

Les albumines ALB. A sont séparées en 10 pics encore hétérogènes en électrophorèse à pH = 3,2 et 8,9, mais dont certains sont très purifiés comparativement au matériel de départ : 3 pics (DEAE-*2 a*, *2 b* et *2 c*) ne sont pas fixés sur la colonne ; 2 autres (DEAE-*2 d* et *2 e*) sont élués par le tampon B, 2 autres (DEAE *2 f* et *2 g*) par le gradient salin et de pH, 2 autres (DEAE-*2 h* et *2 i*) par le tampon D, et un dernier (DEAE-*2 j*) par le tampon E (fig. 3).

On notera plus particulièrement la composition des pics *d* et *f* respectivement très enrichis en *Alb. 14* (ou *Alb. i*) et en *Alb. 13* (ou *Alb. j*).

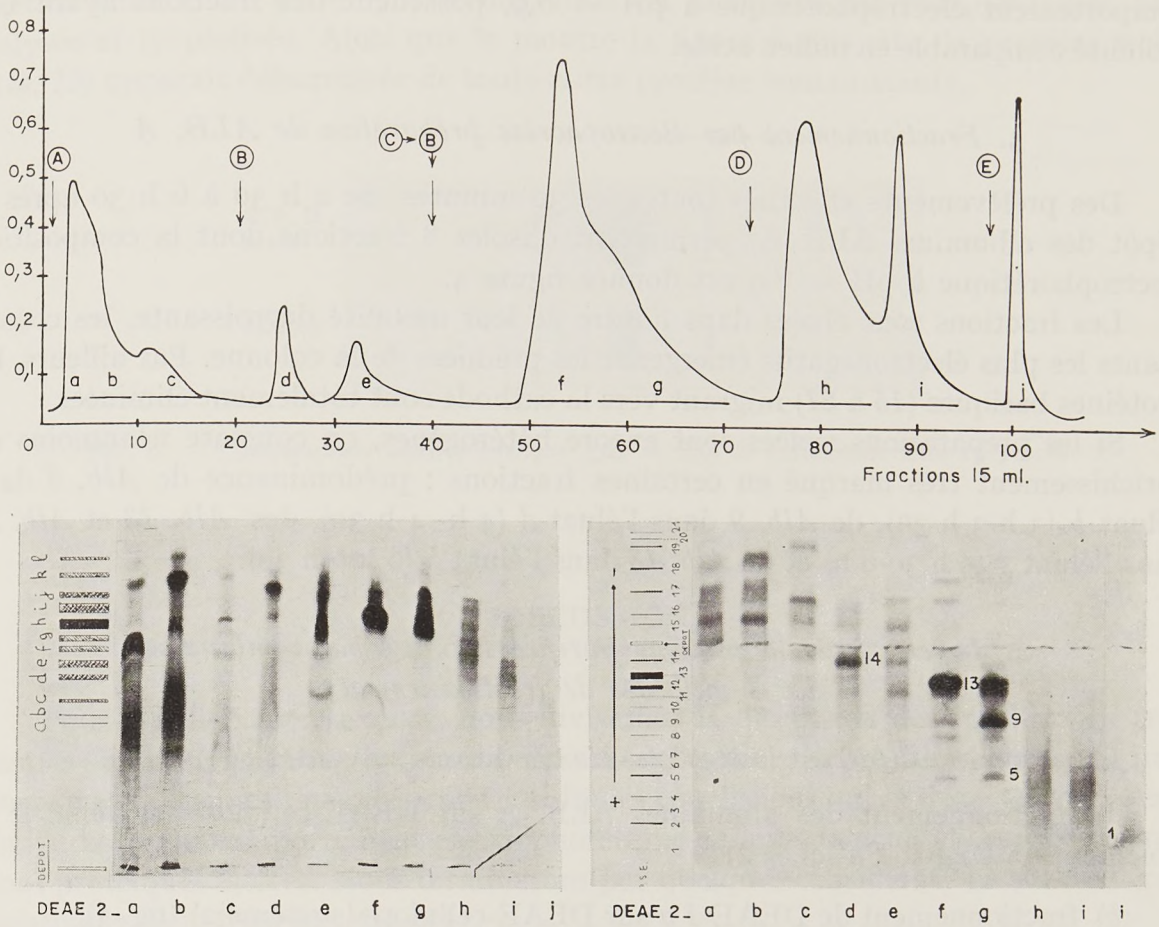


FIG. 3. — *Fractionnement de* ALB. A *sur* DEAE-cellulose (système 2).
Colonne équilibrée en tampon borate pH = 10,4 ;
élution par accroissement de la force ionique et abaissement de pH

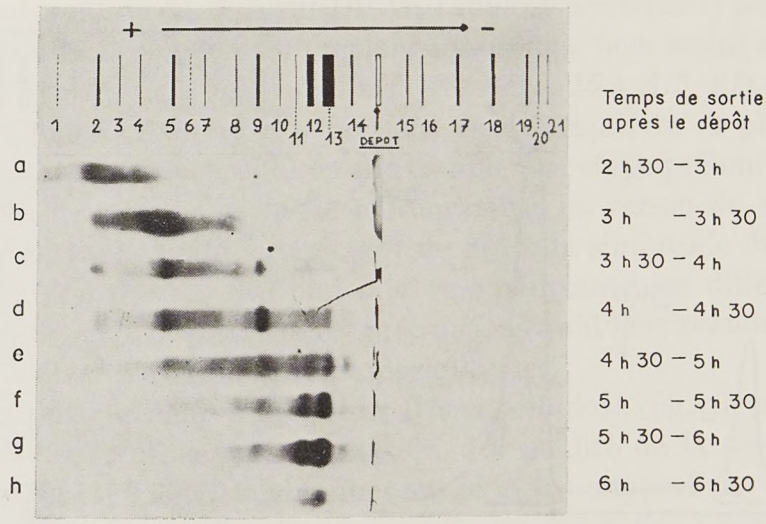


FIG. 4. — *Comportement électrophorétique* (pH = 8,9) *des protéines isolées par électrophorèse préparative*

On remarque par ailleurs que les pics *e* et *h*, parfaitement différenciés par leur comportement électrophorétique à pH = 8,9, possèdent des fractions ayant une mobilité comparable en milieu acide.

3. *Fractionnement par électrophorèse préparative de ALB. A*

Des prélèvements effectués toutes les 30 minutes, de 2 h 30 à 6 h 30 après le dépôt des albumines ALB. A, permettent d'isoler 8 fractions dont la composition électrophorétique à pH = 8,9 est donnée figure 4.

Les fractions sont éluées dans l'ordre de leur mobilité décroissante, les constituants les plus électronégatifs émergeant les premiers de la colonne. Par ailleurs, les protéines basiques (*15* à *21*) migrant vers la cathode sont totalement éliminées.

Si les préparations isolées sont encore hétérogènes, on constate néanmoins un enrichissement très marqué en certaines fractions : prédominance de *Alb. 5* dans l'éluat *b* (3 h-3 h 30), de *Alb. 9* dans l'éluat *d* (4 h- 4 h 30), des *Alb. 13* et *Alb. 12* dans l'éluat *g* (5 h 30-6 h) et de *Alb. 13* dans l'éluat *h* (6 h-6 h 30).

4. *Isolement de la protéine purifiée* Alb. 13 *par combinaison des 3 méthodes de fractionnement*

La protéine *Alb. 13* est isolée dans les conditions suivantes :

a) fractionnement des albumines ALB. A sur DEAE-cellulose (système 1) et isolement de DEAE-*1 a* (cf. § 2) ;

b) fractionnement de DEAE-*1 a* sur DEAE-cellulose (système 2) (fig. 5).

Des 5 pics obtenus, on ne conserve que le dernier (pic *f*) qui est essentiellement constitué de *Alb. 13* mais dans lequel on note néanmoins la présence de protéines contaminantes (*Alb. 8, 9, 10, 12, 15, 17* et *18*) : on donne le nom d'*Alb. 13 brute* à cette fraction. Par ailleurs, le pic *d* est presque uniquement constitué de *Alb. 14* et le pic *e* est très enrichi en *Alb. 20*.

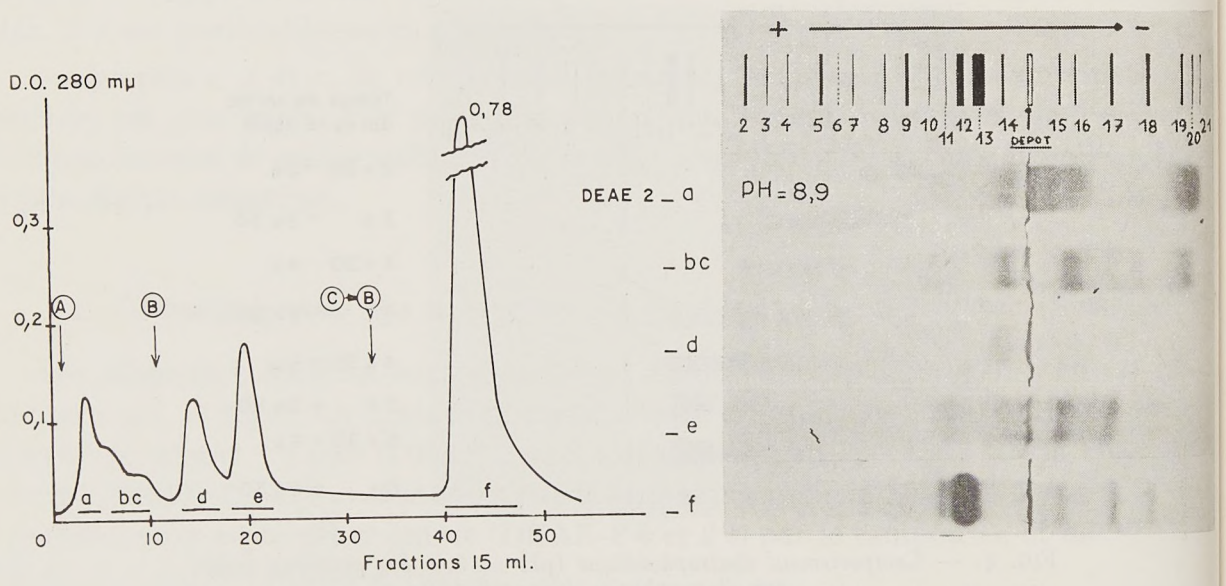


FIG. 5. — *Fractionnement de* DEAE-1 *a sur* DEAE-cellulose (système 2).
Colonne équilibrée en tampon borate pH = 10,4 ;
élution par accroissement de la force ionique et abaissement de pH

c) *l'Alb. 13 brute* (pic *f* précédent) est purifiée par électrophorèse préparative : la fraction éluée entre 4 h et 6 h de migration est précipitée par $(NH_4)_2SO_4$ 3 M, puis dialysée et lyophilisée. Ainsi que le montre la figure 6 suivante, la protéine isolée (*Alb. 13*) apparaît débarrassée de toute autre protéine contaminante.

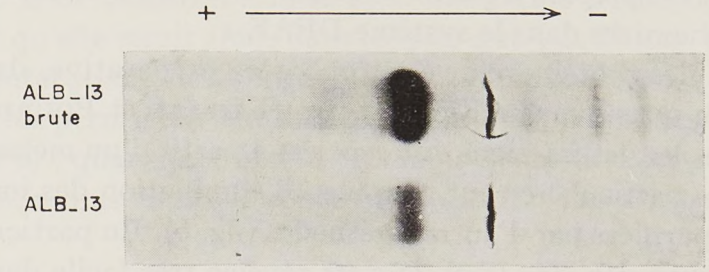


FIG. 6. — *Comportement électrophorétique* (pH = 8,9) *de l'Albumine* Alb. 13 *purifiée*

DISCUSSION

Pour clarifier notre exposé, nous diviserons la discussion des résultats en trois parties : un premier paragraphe sera consacré à l'étude critique des méthodes de fractionnement retenues ; nous verrons ensuite les conclusions qui se dégagent de l'étude comparative du comportement électrophorétique en milieux acide et basique des fractions protéiques isolées. Nous terminerons par quelques considérations sur les caractéristiques de l'albumine *Alb. 13*.

1. *Étude critique des méthodes de fractionnement*

L'isolement de la protéine électrophorétiquement homogène *Alb. 13* fait appel à trois étapes dont les deux dernières sont les plus importantes.

Le fractionnement de ALB. A sur DEAE-cellulose (système 1) permet de préparer en grande quantité et rapidement un mélange protéique bien moins complexe que les albumines initiales, riche en protéines basiques (*Alb. 15* à *Alb. 21*) et en *Alb. 13*, et débarrassé de la plupart des autres fractions électronégatives (à pH = 8,9) ; cette séparation ne doit donc être considérée que comme une étape préliminaire conduisant à l'isolement d'un matériel plus facile à fractionner en raison de sa moins grande hétérogénéité. Il est néanmoins intéressant de noter la similitude du comportement électrophorétique à pH = 8,9 des pics *c*, *d* et *e* pourtant bien différenciés en chromatographie (fig. 2), fait qui illustre les précautions qu'il faut prendre lors de l'interprétation des courbes d'élution chromatographiques.

Le système 2 de chromatographie sur DEAE-cellulose (fig. 3), plus élaboré, conduit à un fractionnement beaucoup plus fin. La qualité de la séparation réalisée, apparemment supérieure à celles obtenues sur le même support par d'autres auteurs (SIMMONDS, 1963 ; NIMMO, 1963 ; TIPPLES et TKACHUK, 1965 ; CLAYTON, 1966) peut probablement s'expliquer par le pH relativement élevé (pH = 10,4) du tampon de départ qui favorise la fixation des protéines sur l'échangeur. Il y a certes des risques de transformation de la structure des protéines dans un milieu aussi alcalin ; mais le

fait que les mobilités électrophorétiques des protéines isolées n'aient apparemment pas subi de transformation permet de conclure que les dénaturations éventuelles sont limitées. La comparaison des figures 3 et 5 montre par ailleurs que le pic DEAE-*2 j* isolé à partir de DEAE-*1 a*, est moins souillé par les protéines électronégatives *Alb. 8* et *5* que lorsqu'il est préparé à partir de ALB. A, d'où l'intérêt du fractionnement préliminaire des albumines dans le système DEAE-1.

La séparation des protéines par électrophorèse préparative, dans les conditions très simplifiées que nous avons mises au point (FEILLET et BOURDET, 1967 *a*), déjà intéressante pour isoler des fractions différenciées à partir d'un mélange très complexe (fig. 4) s'est révélée particulièrement adaptée à l'élimination des impuretés souillant des protéines déjà purifiées par d'autres méthodes (fig. 6). En particulier l'élimination des protéines basiques *Alb. 15*, *17* et *18* s'est révélée très facile dans nos conditions expérimentales, alors que la rechromatographie de *Alb. 13* ne l'avait pas permise.

2. *Comportement électrophorétique des albumines en milieu basique et en milieu acide*

La comparaison des comportements électrophorétiques aux pH 8,9 et 3,2 des 10 pics obtenus par fractionnement des albumines ALB. A sur DEAE-cellulose (fig. 3) est particulièrement intéressante.

On constate, en premier lieu, que la différenciation des pics est bien plus apparente en tampon *Tris* qu'en tampon lactate. En particulier, l'étude des diagrammes obtenus en milieu acide à partir des pics DEAE-*2 b* et DEAE-*2 h* pourrait laisser penser que ces deux pics possèdent des fractions communes, ce qui est manifestement infirmé par leur comportement en tampon *Tris*. On confirme ainsi que des protéines de même mobilité à un pH déterminé peuvent se révéler de nature différente ; cette constatation permet d'expliquer le nombre relativement faible de fractions décelées à pH = 3,2, comparativement à celui décompté à pH = 8,9 (FEILLET et BOURDET, 1968).

De ce fait, la nomenclature précédemment proposée (FEILLET et BOURDET, 1968) ne doit être considérée que comme un moyen de caractérisation des protéines en fonction de leur mobilité et non comme un système d'identification lorsque la séparation électrophorétique est réalisée en milieu acide. Nous parlerons donc des albumines *Alb. 13* ou *Alb. 14* (identifiées par leur mobilité en tampon *Tris*) qui migrent respectivement aux niveaux *h* et *j* à pH = 3,2 (suivant leur mobilité en tampon lactate). De même, il semble que *Alb. 20* migre au niveau *k* et que les groupes de fractions *Alb. 9* à *Alb. 5*, et *Alb. 5* à *Alb. 1* se situent à pH = 3,2 aux niveaux *j* à *f* et *f* à *c*. Il demeure malheureusement impossible pour l'instant de proposer une correspondance plus précise entre les bandes décelées dans les deux systèmes d'électrophorèse.

3. *Albumines* Alb. 13

La méthode d'électrophorèse utilisée dans ce travail pour caractériser l'albumine *Alb. 13* étant différente de celle retenue par KELLEY (1964), il est difficile de comparer nos résultats aux siens. Il semble cependant que la protéine isolée par cet auteur soit plus électronégative que *Alb. 13*, qui serait donc différente du composant 4,7 S de KELLEY. L'électrophorèse en gel d'agar dans les conditions de GRABAR et

al. (1962) nous a par ailleurs montré que *Alb. 13* migrait au niveau de la zone 3 de ces auteurs et se différenciait donc également des fractions purifiées par ces derniers. Eu égard aux conditions de fractionnement de SIMMONDS (1963) et à la composition électrophorétique des pics isolés (GRABAR, 1963), il semble que *Alb. 13* corresponde par contre au pic E de SIMMONDS mais sous une forme beaucoup plus purifiée ; il semble également qu'elle serait éluée dans les pics 4 et 5 de NIMMO et *al.* (1963).

Il est enfin intéressant de souligner que l'albumine *Alb. 13* est l'une des protéines solubles du blé permettant de différencier les blés tendres des blés durs (FEILLET et BOURDET, 1967 *b*) ; quantitativement très importante chez les premiers, elle est en effet absente ou du moins en faible concentration chez les seconds.

CONCLUSIONS

Dans le cadre du travail entrepris sur les protéines solubles du blé, la présente étude nous a permis de mettre au point une méthode de fractionnement des albumines conduisant à l'isolement d'une protéine homogène et à la préparation de certaines fractions beaucoup moins complexes que le matériel de départ. Nous envisageons maintenant de préparer la protéine *Alb. 13* en grande quantité pour en préciser les caractères physicochimiques.

Reçu pour publication en juin 1968.

SUMMARY

SOLUBLE WHEAT PROTEINS.

II. — FRACTIONATION OF ALBUMINS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE AND BY PREPARATIVE ELECTROPHORESIS : ISOLATION OF AN ELECTROPHORETICALLY HOMOGENEOUS PROTEIN

The fractionation of wheat albumins by chromatography on DEAE-cellulose and their purification by preparative electrophoresis on polyacrylamid gel have lead to isolate a wheat protein (*Alb. 13*) homogeneous in electrophoresis in starch gel at pH = 3,2 (lactate buffer) and 8,9 (*Tris*-A buffer) (fig. 6). The separation includes 3 stages :

a) fractionation of the albumins purified by salting out (Alb. A) on a column of DEAE-cellulose equilibrated with a phosphate buffer pH = 7,8. The unfixed proteins resolve into two picks, the first one (DEAE-*Ia*) being dialyzed, then lyophilized after precipitation by $(NH_4)_2(SO_4$ 3 M (fig. 2) ;

b) fractionation of DEAE-*Ia* on a column of DEAE-cellulose equilibrated with a borate buffer pH = 10,4. The DEAE-*2f* pick, eluted by a saline and pH gradient, is collected (fig. 4) ;

c) purification of the DEAE-*2f* pick or *raw Alb. 13* by preparative electrophoresis according to the experimental device shown in figure 1. The highly purified protein *Alb. 13* is thus isolated (fig. 6).

Preparations highly enriched in certain fractions have likewise been isolated in the course of these operations, either by chromatography on DEAE-cellulose (fig. 3), or by preparative electrophoresis (fig. 4).

It has been shown, moreover that wheat albumins could not be identified by their electrophoretic behaviour in an acid medium, some fractions differentiated in *Tris*-buffer having a similar mobility at pH = 3,2.

It is foreseen, in a further stage, to specify the physico-chemical characteristics of the isolated albumin *Alb. 13*.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE LÖSLICHEN PROTEINE DES WEIZENS.
II. — FRAKTIONIERUNG DER ALBUMINE DURCH CHROMATOGRAPHIE AUF DEAE-ZELLULOSE UND DURCH PRÄPARATIVE ELEKTROPHORESIS : ISOLIERUNG EINES ELEKTROPHORISCH HOMOGENEN PROTEINS

Die Fraktionierung der Weizenalbumine durch Chromatographie auf DEAE-Zellulose mit anschliessender Reinigung durch präparative Elektrophoresis auf Polyacrylamidgel erlaubte ein Weizenprotein (*ALB. 13*) zu isolieren, das sich in Elektrophoresis mit Stärkegel bei pH = 3, milchsaurer Puffer) und bei pH = 8,9 (*Tris* Puffer) als homogen erwiesen hat (Abb. 6). Die Trennung wird in 3 Stufen durchgeführt :

a) fraktionierung der durch Einführung (ALB. A) in eine mit Phosphatpuffer auf pH = 7, eingestellte DEAE-Zellulose-Kolonne gereinigten Albumine. Die nicht fixierten Proteine lösen sich bei zwei Spitzen auf, wovon die erste (DEAE-*1a*) dialysiert und darauf, nach Fällung durch $(NH_4)_2SO_4$ 3 M, lyophilisiert wird (Abb. 2) ;

b) fraktionierung der DEAE-*1 a* auf einer mit Boratpuffer auf pH = 10,4 eingestellte DEAE-Zellulose-Kolonne. Man erhält die durch einen salzigen Gradienten mit pH eluierte Spitze DEAE *2f* (Abb. 5) ;

c) reinigung der Spitze DEAE-*2f* oder *rohes Alb. 13* durch präparative Elektrophoresis gemäss der auf Abbildungs schematisierten Anordnung. Auf diese Weise wird das hoch gereinigte Protein *Alb. 13* isoliert (Abb. 6).

Mit bestimmten Fraktionen stark angereicherte Präparate wurden ebenfalls, entweder durch Chromatographie auf DEAE-Zellulose (Abb. 3) oder durch präparative Elektrophoresis (Abb. 4), im Laufe dieser Operationen isoliert.

Es wurde ausserdem gezeigt, dass es nich möglich ist, die Albumine des Weizens nach ihrem Verhalten bei Elektrophoresis in sauerem Milieu zu identifizieren, da einige mit *Tris*-Puffer differenzierte Fraktionen eine dem pH-wert 3,2 entsprechende Beweglichkeit vesitzen.

In Anschluss an diese Arbeit wird beabsichtigt, die physikalisch-chemischen Eigenschaften des isolierten Albumins *Alb. 13* näher zu beschreiben.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CLAYTON J. W., 1966. The extraction and ion-exchange chromatography of buffer-soluble and gluten properties of wheat flour. *Cereal Chem.*, **43**, 495-516.

FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. *Ann. Technol. agric.*, **14**, Hors série 1, 1-94.

FEILLET P., 1967. Les protéines solubles des céréales (mise au point bibliographique). *Ann. Technol. agric.*, **16**, 135-182.

FEILLET P., BOURDET A., 1967 *a*. Méthode simplifiée de fractionnement des protéines par électrophorèse préparative sur colonne de polyacrylamide : application à l'isolement de la sérum-albumine bovine et d'une albumine du blé. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, D, 268-271.

FEILLET P., BOURDET A., 1967 *b*. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49**, 1273-1283.

FEILLET P., BOURDET A., 1968. Les protéines solubles du blé. I.-Isolement et caractérisation des Albumines et des Globulines. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 217-s25

GRABAR P., BENHAMOU N., DAUSSANT J., 1962. Études électrophorétiques et immunochimiques de quelques protéines de l'orge et du blé. *Arch. Biochem. Biophys.*, supp. P1, 187-189.

GRAHAM J. S. D., 1963. Starch gel electrophoresis of wheat flour proteins. *Austral. J. biol. Sci.*, **16**, 342-349.

KELLEY J. J., 1964. Purification and properties of a salt-soluble protein from wheat flour. *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 167-172.

NIMMO C. C., O'SULLIVAN M. T., MOHAMMAD A., PENCE J. W., 1963. Fractionation and zone electrophoresis of proteins of water soluble materials of flour. *Cereal Chem.*, **40**, 390-398.

REXOVA L., KOPEC Z., KEIL B., 1967. Isolation and properties of wheat beta-amylase. *Collection Czech. Chem. Commun.* **32**, 678-684.

SIMMONDS D. H., 1963. Proteins of wheat and flour. The separation and purification of the pyrophosphate-soluble proteins of wheat flour by chromatography of DEAE-cellulose. *Cereal Chem.*, **40**, 110-120.

TIPPLES K. H., TKACHUK R., 1965. Wheat beta-amylases. I. Isolation. *Cereal Chem.*, **42**, 111-124.

TKACHUK R., TIPPLES K. H., 1966. Wheat béta amylases. II. Charactérisation. *Cereal Chem.*, **43**, 62-79.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 277-285.

DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DES TANINS

J. PUISAIS, A. GUILLER, J. LACOSTE et P. HUTEAU

Laboratoire départemental d'Analyses et de Recherches, 37 - Tours

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié une technique de dosage des « tanins » du vin par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

Cette méthode, appliquée sur le vin avant et après relargage au chlorure de sodium, permet d'apprécier les teneurs en leucoanthocyanes totaux et en leucocyanidol. Il est également possible, au cours de l'examen, de connaître les apports de tanins exogènes.

INTRODUCTION

Reprenant, d'une part les travaux de P. Ribéreau-Gayon, sur l'étude spectrophotométrique des vins rouges dans le domaine ultraviolet, et d'autre part, ceux de Masquelier sur le dosage colorimétrique des leucoanthocyanes, nous avons pu mettre au point une méthode rapide de dosage des « tanins » du vin.

Des examens spectrophotométriques du vin dans l'UV permettent d'effectuer les dosages :

— des flavanes 3-4 diols ou leucoanthocyanes monomères (à grande activité vitaminique P) constitués par du leucocyanidol pour l'essentiel et aussi par du leucodelphinidol;

— des leucoanthocyanes totaux, comprenant à côté des formes monomères, des formes polymérisées ou tannoïdes, à propriétés tannates.

Il est également possible de doser parallèlement les « tanins » exogènes du vin, c'est-à-dire les tanins extraits généralement de la noix de galle et qui sont ajoutés au vin au cours de la vinification ou des manipulations (collage).

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

A. — *Appareil utilisé*

Nous avions à notre disposition le spectrophotomètre enregistreur Spila, équipé de l'enregis treur CR 20 et d'une source d'ultraviolet 200 à 400 mμ.

Pour l'utilisation et le réglage de l'appareil, les techniques générales d'emploi étaient suivies L'on peut, néanmoins, citer que les méthodes de mesures sont réalisées en différentiel, fente 1, dérou lement du spectre 150 mμ/minute. La vitesse de l'enregistreur était à l'index 9, ce qui correspond à 10 mμ/cm.

Toutes les mesures ont été enregistrées en transmission puis converties en densité optique.

B. — *Étude spectrophotométrique du leucocyanidol*

D'après la technique de P. RIBÉREAU-GAYON (1957) pour l'étude de l'absorption dans l'ultra violet du leucocyanidol, nous avons utilisé le solvant préconisé par cet auteur (solution hydroalcoo lique à 10°, pH 3,20, 5 g/l d'acide tartrique neutralisé à pH 3,20 par de la potasse).

Nous avons pu ainsi tracer le spectre d'absorption dans l'ultraviolet du leucocyanidol pu extrait suivant la technique de MASQUELIER, de l'écorce du Pin maritime et mis en solution dans l solvant précité, et d'un vin rouge dilué à l'aide de ce même solvant (les dilutions choisies permetten que les concentrations en leucocyanidol soient voisines dans les deux cas).

Les tracés des spectres ainsi obtenus sont reproduits sur la courbe d'enregistrement de la figure 1

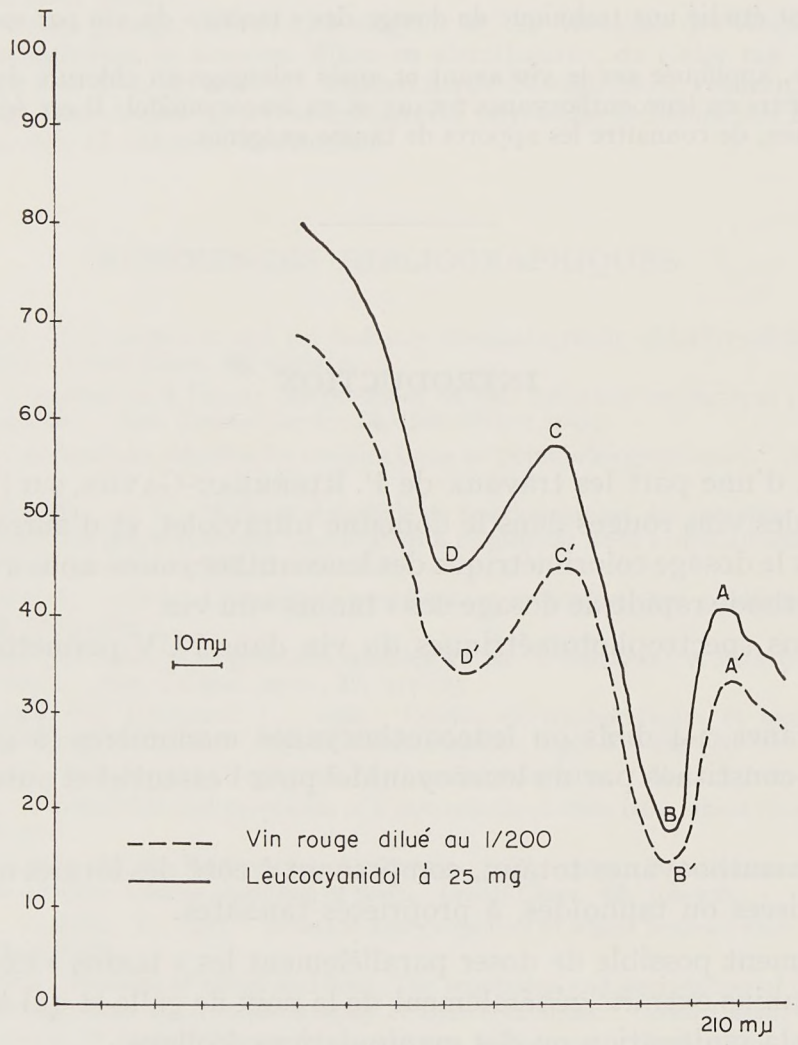


FIG. 1.

1. Bien qu'elle soit approximative sur le plan théorique, on observe une superposition convenable aussi bien pour les vins rouges, rosés et blancs d'âges et d'origines différents.

2. La proportionnalité des densités optiques et les étalonnages sont satisfaisants à toutes les longueurs d'onde.

3. Les courbes présentent deux maximums d'absorption aux mêmes longueurs d'onde 235 mμ 280 mμ.

4. La plus grande absorption se situe entre 230 et 240 mμ et ce spectre, pour les vins, est semblable à celui du leucocyanidol malgré la présence d'autres composés phénoliques qui n'interfèrent pas en raison de leur faible concentration.

Le leucocyanidol subit un effet bathochrome lorsque le solvant est neutre, c'est pourquoi le solvant acide préconisé par P. RIBÉREAU GAYON convient parfaitement en ultraviolet et que l'on ne note pas ainsi de déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.

5. Il existe un second maximum d'absorption, se situant à 280 mμ, correspondant aux cycles benzéniques, et qui ne subit pas d'effet bathochrome ou hypsochrome car, dans ce cas, l'influence du pH est nulle.

C. — *Interprétation des courbes d'enregistrement des spectres*

La hauteur du pic a 230/240 mμ, c'est-à-dire la différence de densité optique mesurée à 225 mμ et 235 mμ.

Hauteur du pic = DO 225 mμ — DO 235 mμ (B-A) est proportionnelle à la concentration en leucocyanidol (voir enregistrement de la figure 2).

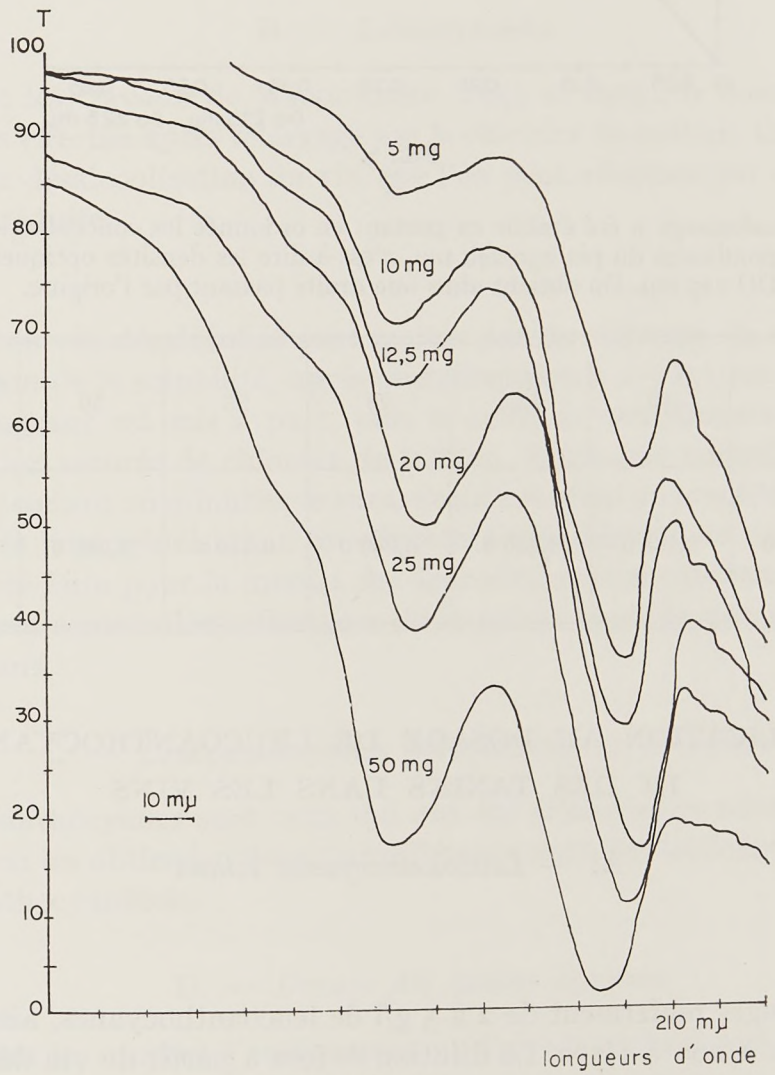


FIG. 2.

Cette particularité nous a permis d'établir une courbe d'étalonnage (fig. 3) à partir de leucocyanidol pur mis en solution dans le solvant préconisé.

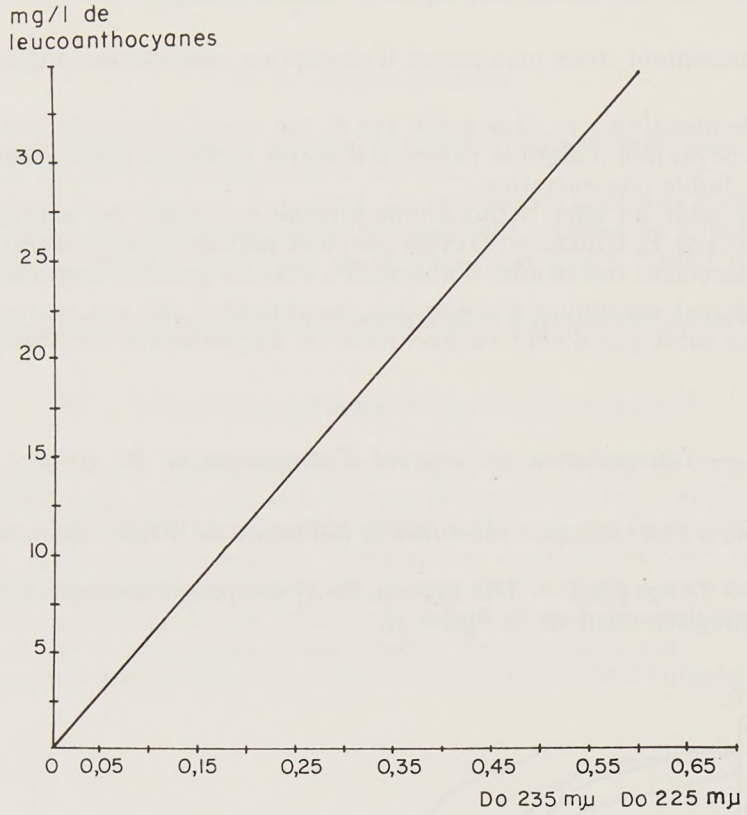


FIG. 3.

La courbe d'étalonnage a été établie en portant en ordonnée les concentrations et en abscisse les hauteurs correspondantes du pic 230/240 mμ, c'est-à-dire les densités optiques correspondantes au DO 235 mμ — DO 225 mμ. On obtient ainsi une droite passant par l'origine.

0	5	10	12,5	20	25	50	Concentration mg/l de leucocyanidol
0	0,090 0	0,180 0	0,250 0	0,360 0	0,450 0	1,500 0	DO 225 mμ DO 235 mμ (B-A)

APPLICATION AU DOSAGE DE LEUCOANTHOCYANES ET DES TANINS DANS LES VINS

A. — *Leucoanthocyanes totaux*

1. *Vins rouges.*

Dilution.

Les vins rouges renferment de 2 à 5 g/l de leucoanthocyanes, ainsi les dilutions devront être de 1/200 à 1/500. La dilution se fera à partir de vin désalcoolisé (voir dosage du leucocyanidol) et dans le solvant hydroalcoolique à pH 3,20.

Si l'on désire effectuer seulement le dosage des leucoanthocyanes totaux, la désalcoolisation n'est pas nécessaire.

Enregistrement.

La courbe d'enregistrement du spectre dans l'ultraviolet entre 210 et 300 mμ, permet de mesurer la concentration en leucoanthocyanes du vin considéré. En effet, la différence de densité optique DO 235 mμ — DO 225 mμ permet, en se rapportant à la courbe d'étalonnage préalablement établie, d'obtenir directement la concentration en leucoanthocyanes totaux compte tenu de la dilution.

2. *Vins rosés.*

On suivra la même technique de dosage employée pour les vins rouges mais la dilution à effectuer doit être légèrement inférieure étant donné la teneur plus faible en leucoanthocyanes de ces vins.

3. *Vins blancs.*

Pour les vins blancs ne renfermant que de très faibles quantités de leucoanthocyanes, il est nécessaire d'effectuer des dilutions de l'ordre du 1/20 seulement.

B. — *Leucocyanidol*

Reprenant les travaux de MASQUELIER (1959 et 1965), le dosage du leucocyanidol des vins s'effectue après relargage par le chlorure de sodium. Ce relargage exige tout d'abord la désalcoolisation du vin que l'on peut effectuer par chauffage à 45°C sous pression réduite.

Technique.

Cinq cm³ de vin désalcoolisé sont traités par du chlorure de sodium pulvérisé jusqu'à cessation de la solubilité, après centrifugation à 2 500 t/mn pendant 20 minutes, le surnageant est mis à part, puis le culot de centrifugation est lavé avec 5 cm³ de solution saturée de chlorure de sodium. Après une nouvelle centrifugation à 2 500 t/mn, pendant 20 minutes, le surnageant est réuni au précédent puis complété à 10 cm³. Après homogénéisation, on effectuera une dilution de moitié par rapport à celle qui a été faite pour la mesure des leucoanthocyanes totaux.

Les mesures seront alors effectuées de la même manière que pour les leucoanthocyanes totaux.

C. — *Leucoanthocyanes polymérisées ou tannoïdes*

Ces leucoanthocyanes sont ceux qui ont été éliminés par relargage au chlorure de sodium et on les obtiendra donc par différence entre les leucoanthocyanes totaux et les leucoanthocyanidols.

D. — *Dosage des tanins exogènes*

En étudiant les courbes d'enregistrement d'un vin n'ayant jamais reçu de tanins et d'une solution de leucocyanidol à la même concentration, on constate que les

courbes se superposent bien que les valeurs absolues des maximums d'absorption soient différentes.

Cette superposition montre encore :

1° les hauteurs en DO des pics à 230 mμ (A, B et $A_/$, $B_/$) identiques dans les deux cas ;

2° les hauteurs en DO des pics à 280 mμ (C, D et $C_/$, $D_/$) elles aussi identiques

3° la différence des DO des pics D 230 mμ — D 280 mμ est évidemment la même

Dans le cas de vins ayant reçu une certaine quantité de tannins exogènes, la relation 1 se trouve toujours vérifiée alors que, en 3, on constate que D 230 mμ — D 280 mμ diminue. La distance B-D tend à diminuer lorsque le vin reçoit du tanin (courbe d'enregistrement de la fig. 4).

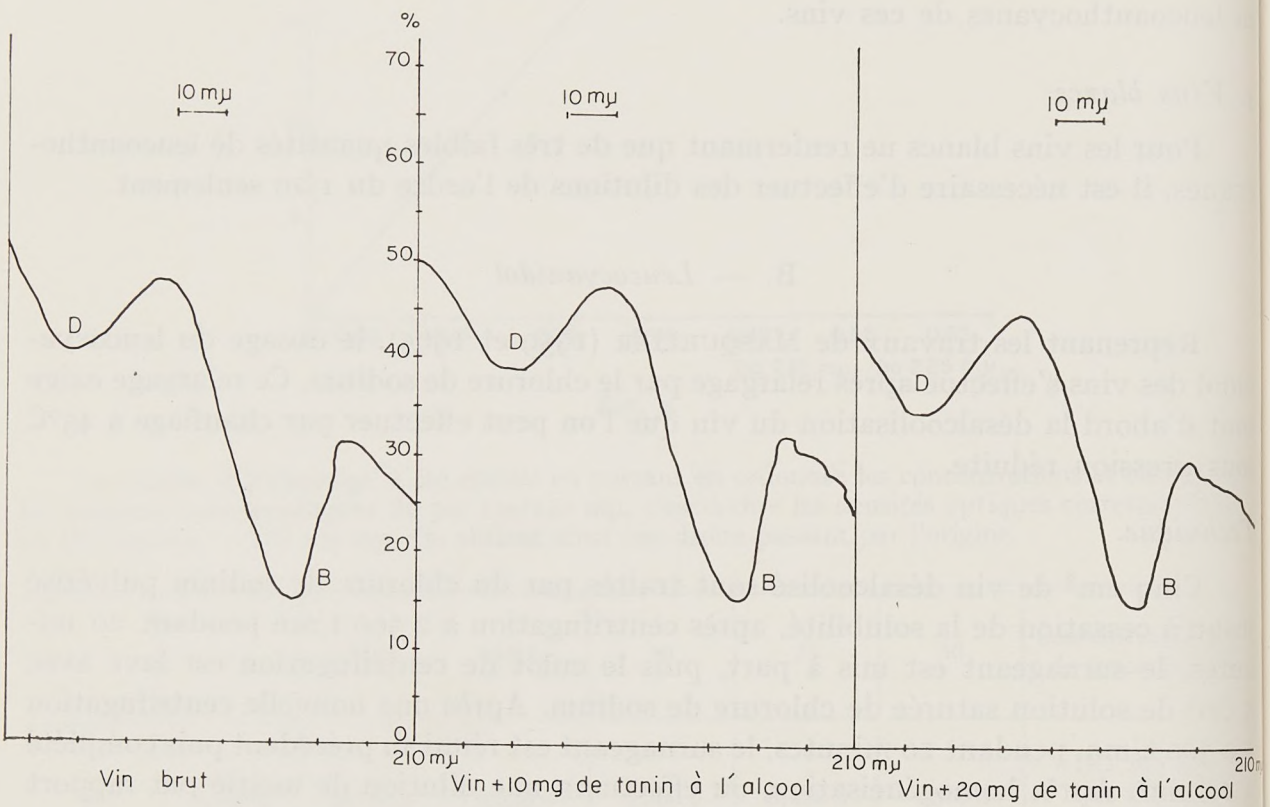


FIG. 4.

Technique d'évaluation des tanins exogènes.

Nous avons pu établir une courbe d'étalonnage (fig. 5) à partir de leucocyanidol en solution dans le solvant hydroalcoolique, en considérant les densités optiques D 230 mμ — D 280 mμ en fonction de la concentration (voir courbe d'enregistrement de la fig. 2).

On obtient une droite qui permettra de connaître la teneur en leucoanthocyanes totaux dans un vin.

Si cette mesure donne une valeur identique à celle obtenue à l'aide de la courbe du pic à 225/235 mμ, on est alors en présence d'un vin qui n'a pas reçu de tanins exogènes.

Par contre, si ces deux mesures ne correspondent pas, leur différence est en rapport avec la concentration de tanins exogènes.

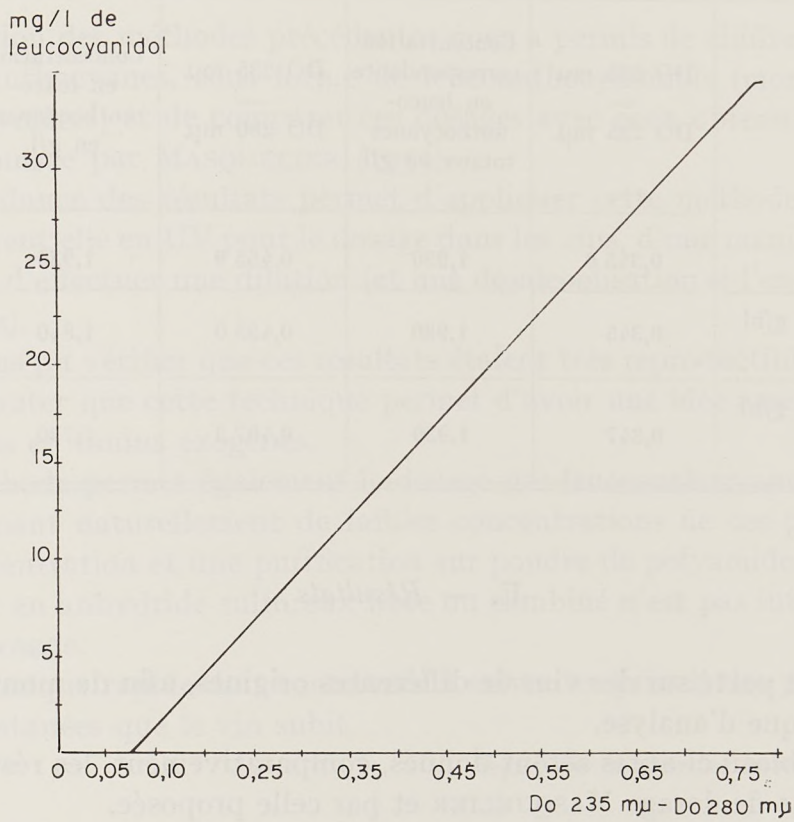


FIG. 5.

A l'aide des enregistrements suivants (fig. 4) ayant été obtenus sur :

1. vin brut dilué au 1/100 ;
2. vin brut + 10 g/hl de tanins (dilué au 1/100) ;
3. vin brut + 20 g/hl de tanins (dilué au 1/100) ;

on voit que les D 230 mμ — D 280 mμ (distance B-D) diminuent en fonction des tanins ajoutés.

Tableau des valeurs d'étalonnage

0	5	10	12,5	20	25	Concentration en mg/l de leucocyanidol
0	0,190 0	0,280 0	0,324 0	0,455 0	0,585 0	DO 230 mμ DO 280 mμ — (B-D)

Dans le tableau ci-dessous se trouvent rassemblés les vérifications de mesures de tanins exogènes :

	DO 225 mμ — DO 235 mμ	Concentration correspondante en leuco-anthocyanes totaux en g/l	DO 235 mμ — DO 280 mμ	Concentration en leuco-anthocyanes en g/l	Tanins exogènes en g/l
Vin brut	0,345 0	1,930	0,455 9	1,930	0
Vin brut + 10 g/hl de tanins	0,345	1,930	0,433 0	1,840	0,090 soit 9 g/hl
Vin brut + 20 g/hl de tanins	0,347	1,930	0,407 3	1,730	0,090 soit 20 g/hl

E. — *Résultats*

Ceux-ci ont porté sur des vins de différentes origines, afin de montrer l'efficacité de cette technique d'analyse.

Dans le tableau ci-après seront donnés, comparativement, les résultats obtenus par la technique de dosage MASQUELIER et par celle proposée.

Des vins de grande distribution (échantillons A à H) ainsi que des vins issus de cépages uniques *Cabernet* et *Gamay*, ont été choisis.

Vins expérimentés	Technique MASQUELIER			Technique proposée		
Origines	Leuco-anthocyanes totaux g/l	Leuco-cyanidol (formes monomères) g/l	Tannoïdes (formes polymérisées) g/l	Leuco-anthocyanes totaux g/l	Leuco-cyanidol (formes monomères) g/l	Tannoïdes (formes polymérisées) g/l
Vin A 11°	2,175	1,750	0,425	2,200	1,750	0,450
Vin B 9,5°.....	1,900	1,300	0,600	1,900	1,400	0,500
Vin C 10°	2,250	1,700	0,550	2,225	1,800	0,425
Vin D 9,5°.....	1,850	1,650	0,200	1,900	1,650	0,250
Vin E 9°	1,400	1,150	0,250	1,500	1,200	0,300
Vin F 10°	1,500	1,250	0,250	1,450	1,150	0,300
Vin G 12°	2,350	1,900	0,350	2,300	1,900	0,400
Vin H 10°	2,450	1,650	0,700	2,400	1,650	0,750
Gamay Beaujolais brut.....	0,950	0,720	0,230	0,920	0,700	0,220
Cabernet Franc brut.	1,550	1,250	0,300	1,525	1,200	0,325
Cabernet Franc (collé et filtré)	1,900	1,560	0,340	1,940	1,600	0,340
Gamay (collé et filtré)	0,950	0,700	0,250	0,950	0,720	0,230

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'application des méthodes précédentes nous a permis de chiffrer la teneur des vins en leucoanthocyanes, sous forme de leucoanthocyanidols (monomères) et de tannoïdes (polymères) et de comparer ces dosages avec ceux obtenus à l'aide de la méthode préconisée par MASQUELIER (1959).

La concordance des résultats permet d'appliquer cette méthode spectrophotométrique différentielle en UV pour le dosage dans les vins, d'une manière très rapide, puisqu'il suffit d'effectuer une dilution (et une désalcoolisation si l'on dose les leucoanthocyanidols).

Nous avons pu vérifier que ces résultats étaient très reproductibles.

Il faut ajouter que cette technique permet d'avoir une idée assez précise sur la teneur des vins en tanins exogènes.

Cette méthode permet également le dosage des leucoanthocyanes dans les vins blancs renfermant naturellement de faibles concentrations de ces produits, ce qui évite une concentration et une purification sur poudre de polyamide.

La teneur en anhydride sulfureux libre ou combiné n'est pas intervenue sur les résultats du dosage.

Cette technique rapide doit contribuer à suivre les principales phases technologiques ou spontanées que le vin subit.

Reçu pour publication en novembre 1968.

SUMMARY

SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENT OF TANNINS

The authors have studied the UV absorption spectra of a leucocyanidol extract from *Pinus maritima* by MASQUELIER'S technique.

The study of these spectra has enabled the relationship to be determined between the absorption peaks and the concentration of a solution.

The absorption spectra of leucocyanidol and of the wines have yielded results similar to those obtained by the method of chemical measurement, making use of the transformation of leucocyanidol into cyanidol.

The application of this technique makes it possible to measure rapidly and simultaneously in red, white or *rosé* wines the total leucoanthocyanins and, after salting out to sodium chloride, to estimate the leucoanthrocyanidols in monomeric form and the tannoids in polymerized form.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MASQUELIER J., 1959. Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **98**, 145.

MASQUELIER J., MICHAUD J., TRIAUD Mlle J., 1965. Fractionnement des leucoanthocyanes du vin. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **104**.

RIBÉREAU-GAYON P., 1957. Le leucocyanidol dans les vins rouges. *C. R. Acad. Agric. France*, **43**, 197, 596 et 821.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. anal.*, **48**, 188-196.

SILVERSTEIN R. M., CLAYTON G., 1968. *Identification spectrophotométrique des composés organiques*, 122-142. Bassler Masson et Cie, Gauthier-Villard, Paris.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 287-297.

FIXATION A L'OBSCURITÉ DU $^{14}CO_2$ GAZEUX PAR DES BAIES DE RAISIN, EN ANAÉROBIOSE

C. FLANZY, M. FLANZY, P. ANDRÉ, Y. CHAMBROY
avec la collaboration technique de Geneviève MIGLIORI et M. TACCHINI

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, 84 - Montfavet
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Des baies, mûres et saines, de raisin variété *Gros vert*, sont placées dans des enceintes dont l'atmosphère est formée de 99 p. 100 d'argon. Après apport de $^{14}CO_2$, les enceintes sont placées à l'obscurité durant une heure et deux heures à 35°C.

La radioactivité est retrouvée en majeure partie dans les trois acides du cycle de Krebs : malate, succinate, citrate. La somme des radioactivités des acides organiques est retrouvée à 74 p. 100 dans le malate, après une heure, et à 91 p. 100 après deux heures.

Une très faible activité est décelée après deux heures dans l'aspartate et le glutamate.

Les diverses voies de fixation du CO_2 et de redistribution du carbone marqué à partir des composés primaires sont envisagées et discutées.

INTRODUCTION

Au cours d'essais antérieurs sur la fermentation intracellulaire des baies de raisin placées en anaérobiose carbonique, nous avons constaté qu'un fort pourcentage du CO_2 présent dans les enceintes expérimentales était absorbé par le matériel végétal. Cette absorption a lieu dans les premières heures qui suivent la mise en contact des baies avec le gaz carbonique non radioactif (FLANZY et *al.*, 1967).

Ce fait nous a suggéré que le CO_2 absorbé, dissous dans le suc cellulaire, pouvait être incorporé dans les substrats du raisin. Aussi, pour étudier son devenir, avons-nous procédé cette fois à des apports d'anhydride carbonique radioactif.

(1) *Abréviations :*
i.p.m. : impulsions par minute.
RT : radioactivité totale exprimée en impulsions par minute.
RS : radioactivité spécifique exprimée en impulsions par minute par micromole.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

1. *Méthodes*

Préparation du matériel végétal.

Des raisins blancs (3 kg), variété *Gros vert*, en provenance du commerce, sont sélectionnés d'après les critères de maturité apparente et de bon état sanitaire. Les baies de volume moyen sont séparées du pédicelle au ras du bourrelet, et réparties en trois lots, à raison d'une baie par lot. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un ensemble de 100 baies par échantillon (251 ± 1 g).

Incorporation de $^{14}CO_2$.

Les fixations de $^{14}CO_2$ (une heure et deux heures) sont réalisées sur deux de ces lots, le troisième lot devant servir à contrôler les variations éventuelles des teneurs en acides organiques au cours de l'expérience.

Les baies (représentant un volume de 250 ml) sont placées dans un récipient clos (fig. 1) de 550 ml. Celui-ci contient également un bécher où sont versés 5 ml de solution aqueuse de $Na_2{}^{14}CO_3$ (1,4 mg correspondant à 0,30 ml de $^{14}CO_2$; RT = 500 µCi ; RS = 37,9 mCi par mM.)

L'air est alors chassé de l'enceinte et remplacé progressivement par de l'argon au moyen de trois cycles, vide-argon, selon une technique essayée préalablement. Pour créer l'atmosphère anaérobie, l'argon a été préféré au gaz carbonique de manière à éviter une dilution du $^{14}CO_2$, des échanges isotopiques et l'inhibition possible de la succinodéshydrogénase qui intervient pour des concentrations de CO_2 supérieures à 10 p. 100 (RANSON, 1953).

D'autre part, l'argon étant plus dense que l'air, sa manipulation est plus commode que celle de l'azote. Enfin, le rôle de l'argon dans le métabolisme des raisins placés en anaérobiose paraît insignifiant (travaux en cours).

Une légère dépression est créée à la propipette dans le récipient ; cela permet de libérer le $^{14}CO_2$ (concentration dans l'atmosphère enclose : 1 p. 1 000), par l'addition dans la solution aqueuse radioactive, de 1 ml de $HClO_4$ pur contenu dans une ampoule à décantation placée au-dessus du bécher (fig. 1).

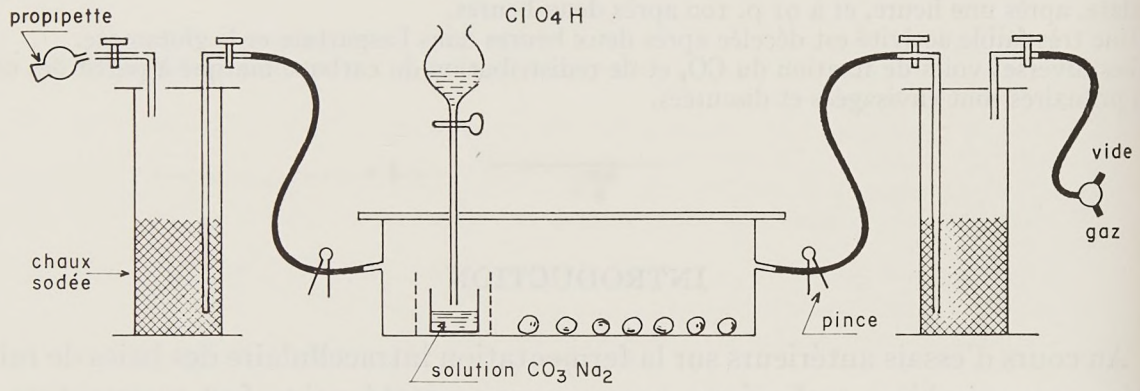


FIG. 1. — *Dispositif d'incorporation*

Les enceintes sont alors transportées en chambre noire, thermostatée à 35°C, et les baies sont laissées en présence de $^{14}CO_2$ pendant respectivement une heure et deux heures. Ces durées sont choisies d'après les résultats d'essais antérieurs (FLANZY et *al.*, 1967). Passés ces délais, le $^{14}CO_2$ non utilisé est fixé sur chaux sodée et les baies prélevées pour analyse.

2. *Techniques d'analyse*

Les baies sont pressurées à la température de la glace fondante (0°C). Le jus obtenu (140 ml) est centrifugé à froid, 5 mn à 1 000 *g* environ. Le surnageant est prélevé pour l'analyse des acides aminés libres, des acides organiques non cétoniques, des acides cétoniques (fig. 2).

Acides aminés libres.

Cinquante ml de surnageant sont passés immédiatement à 4°C sur une colonne de Permutite 50 forme H^+. Les acides aminés fixés sur la colonne, sont élués par NH_4OH 2N (100 ml) puis par NH_4OH 4N (150 ml) selon la technique proposée par FAUCONNEAU et PION (1965). Les éluats sont lyophilisés et conservés jusqu'à l'emploi.

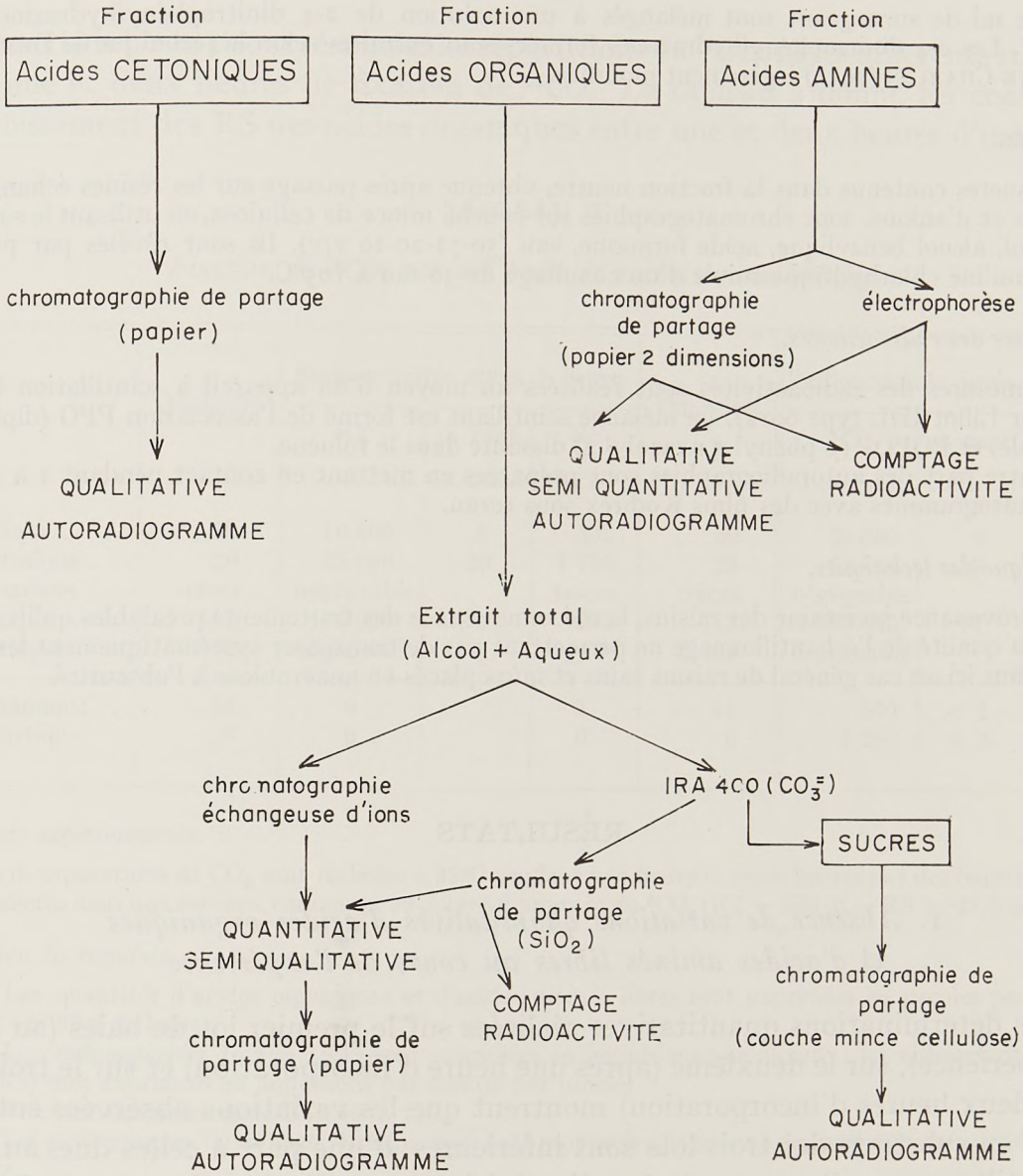


FIG. 2. — *Schéma analytique*

Au moment de l'analyse, les acides aminés sont repris par 2 ml d'eau. Une prise aliquote (25 µ l) est soumise à une chromatographie sur papier à deux dimensions selon la technique de FAUCONNEAU et PION (1965) mais en utilisant le solvant de Wolfe modifié :

— premier mélange éluant : *n*-butanol/éthanol/méthyléthylcétone/ammoniaque (d = 0,90)/eau bidistillée (3-2-3-1-1-v/v) ;

— deuxième mélange éluant : *n*-butanol/acide acétique concentré/eau bidistillée (4-1-5-V/V).

Des séparations électrophorétiques sont également effectuées en utilisant un appareil Shandon. Les électrophorèses de l'extrait total des acides aminés et de l'extrait des acides aminés acides sont réalisées dans les conditions respectives suivantes :

durée 5 heures, tampon pH : 6,55, tension 200 V, intensité 2,5 mA pour l'extrait total ;

durée 6 heures, tampon pH : 4,05, tension 200 V, intensité 2,5 mA pour l'extrait acide.

Acides organiques non volatils, non cétoniques.

50 ml de surnageant sont versés dans de l'éthanol bouillant. Après refroidissement les acides organiques sont séparés et déterminés selon des techniques dérivées de celles décrites par ROUX et LESAINT (1959).

Acides cétoniques.

Deux ml de surnageant sont mélangés à une solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans $HClO_4$ 2 N. Les 2-4 dinitrophénylhydrazones formées sont extraites selon la technique de DESVEAUX et KOGANE-CHARLES (1955) légèrement modifiée.

Sucres.

Les sucres contenus dans la fraction neutre, obtenue après passage sur les résines échangeuses de cations et d'anions, sont chromatographiés sur couche mince de cellulose, en utilisant le solvant: *n*-propanol, alcool benzylique, acide formique, eau (50-72-20-20 v/v). Ils sont révélés par pulvérisation d'aniline chlorhydrique suivie d'un chauffage de 30 mn à 105°C.

Mesure des radioactivités.

Les mesures des radioactivités sont réalisées au moyen d'un appareil à scintillation liquide (compteur Elliot IDL type 6012). Le mélange scintillant est formé de l'association PPO (diphényle 2-5 oxazole) et POPOP (*p* phényl-5 oxazolyl 2) dissoute dans le toluène.

D'autre part des autoradiographies sont préparées en mettant en contact pendant 1 à 4 mois les chromatogrammes avec des films Kodirex sous écran.

Critique des techniques.

La provenance incertaine des raisins, la méconnaissance des traitements préalables qu'ils ont pu subir et la qualité de l'échantillonnage ne permettent pas de transposer systématiquement les résultats obtenus ici au cas général de raisins sains et mûrs placés en anaérobiose à l'obscurité.

RÉSULTATS

1. *Absence de variations quantitatives d'acides organiques et d'acides aminés libres au cours de l'expérience*

Les déterminations quantitatives réalisées sur le premier lot de baies (au début de l'expérience), sur le deuxième (après une heure d'incorporation) et sur le troisième (après deux heures d'incorporation) montrent que les variations observées entre les teneurs en substrats des trois lots sont inférieures, d'une part à celles dues au mode d'échantillonnage, d'autre part à celles inhérentes à l'utilisation des techniques d'analyses.

Il en résulte que les teneurs des baies en acides organiques et en acides aminés libres, au cours de l'expérience, peuvent être considérées comme constantes.

2. *Détection d'activité*

Les autoradiographies sont positives pour les acides malique, succinique, citrique et fumarique. Elles sont négatives pour les acides shikimique et tartrique.

La fraction acides aminés de l'échantillon ayant fixé le $^{14}CO_2$ durant deux heures, possède une faible radioactivité ; cette activité se retrouve principalement dans l'acide aspartique et l'acide glutamique.

Les fractions acides cétoniques et substances neutres ne présentent pas, apparemment, de radioactivité.

3. *Distribution de la radioactivité dans les acides organiques et les acides aminés libres*

Dans le tableau I sont résumées les répartitions du ^{14}C dans les différents substrats après une et deux heures de fixation de $^{14}CO_2$. Le tableau 2 donne les coefficients d'accroissement des RS des acides organiques entre une et deux heures d'incorporation.

TABLEAU I

Fixation de $^{14}CO_2$ par des baies de raisin en anaérobiose

	Quantités	Radioactivités après 1 heure			Quantités	Radioactivités après 2 heures		
		RT	p. cent	RS		RT	p. cent	RS
Ac. citrique.....	30	10 000	6	333	30	36 000	3	1 186
Ac. succinique	20	35 000	20	1 730	20	62 000	5	3 095
Ac. fumarique	traces	négligeable		traces	traces	négligeable		traces
Ac. malique	447	131 000	74	293	447	1 058 000	91	2 367
Ac. tartrique	3 000	négligeable		$\simeq 0$	3 000	négligeable		$\simeq 0$
Ac. glutamique ...	41	0		0	41	960	< 1	24
Ac. aspartique	6	0		0	6	1 280	< 1	213

Conditions expérimentales.

Les incorporations de CO_2 sont réalisées à 35°C pendant une heure et deux heures par des baies de raisin. (250 g) placées dans une enceinte contenant 99 p. cent d'argon et du $^4CO_2$ (RT = 500 µCi ; RS = 37,9 mCi/mM).

Expression des résultats.

— Les quantités d'acides organiques et d'acides aminés libres sont exprimées en µmoles pour 50 ml de moût ($\simeq$ 90 g de baies).

— Les radioactivités totales (RT) sont exprimées en impulsions par minute ; les radioactivités spécifiques (RS) sont exprimées en impulsions par minute par µmole.

— Précision des mesures de RS : 40 p. 100.

— Les pourcentages de radioactivité (p. cent) sont rapportés à la somme des radioactivités des différents substrats.

— Les RT des acides glutamique et aspartique sont déterminées à partir du seul éluat 2 N.

TABLEAU 2

Coefficients d'accroissement entre 1 et 2 heures d'incorporation des RS d'acides organiques

Malate	Citrate	Succinate	Fumarate
8,1	3.6	1,8	$\simeq 1$

Après une heure d'expérience, la radioactivité se retrouve principalement dans le malate mais aussi dans le succinate qui présente nettement la RS la plus élevée. Le citrate est également marqué, mais plus faiblement. Seules des traces de radioactivité peuvent être détectées dans le fumarate. Le tartrate, acide prédominant de la baie de raisin, n'apparaît pas marqué.

Le taux d'incorporation dans les acides organiques passe de $5 \cdot 10^{-4}$ après une heure à $3 \cdot 10^{-3}$ après deux heures d'expérience.

La radioactivité fixée au cours de la deuxième heure ($980 \cdot 10^3$ ipm) est environ 6 fois plus forte que celle fixée au cours de la première heure ($156 \cdot 10^3$ ipm) : ce calcul ne tient pas compte de la fraction de radioactivité fixée au cours de la première heure qui a pu être perdue au cours de la seconde. Après deux heures, la quasi-totalité du ^{14}C se retrouve encore dans le malate dont la RS a (cependant) fortement augmenté. Toutefois, c'est toujours le succinate qui présente la RS la plus forte. D'autre part, le ^{14}C devient détectable dans l'aspartate et le glutamate. Les RT des acides aminés basiques, neutres et acides (déterminées à partir des éluats NH_4OH 2 N + 4 N) sont alors respectivement de 240, 320 et 3 200 ipm.

DISCUSSION

L'analogie entre la distribution du ^{14}C dans les différents substratsa près une heure et la distribution après deux heures suggère que les réactions de fixation du $^{14}CO_2$ sont similaires tout au long de l'expérience. La fixation du $^{14}CO_2$, faible en valeur absolue, est accélérée entre une et deux heures ; ceci semble traduire l'existence d'une première phase de latence à laquelle succède une deuxième phase où les réactions de réduction deviennent prépondérantes comme le témoigne la répartition de la quasi-totalité du ^{14}C dans le malate (Jolivet, 1963).

Il convient de distinguer deux étapes dans ce phénomène d'incorporation du $^{14}CO_2$: la première, sous la dépendance des enzymes de la carboxylation, réside dans la fixation, sous forme de composés primaires, du CO_2 dissous dans le suc cellulaire. La seconde correspond à la distribution du ^{14}C à partir du ou des composés primaires.

Formation du ou des composés primaires

Les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer par quelle (s) réaction (s) primaire (s) le ^{14}C du $^{14}CO_2$ est incorporé. Cependant, le malate étant le principal substrat marqué, on peut penser que la fixation du ^{14}C a lieu par l'un des systèmes suivants :

— Carboxylation du pyruvate libre en malate sous l'action de l'enzyme malique (NADP) dont la présence et le fonctionnement dans la baie de raisin ont été signalés (Meynhardt, 1965 ; Slack et Hatch, 1967). Le déroulement de cette réaction est d'autant plus plausible qu'elle est favorisée par de fortes concentrations en CO_2, donc des états d'anaérobiose (Walker, 1962).

— Carboxylation du pyruvate libre en oxaloacétate (sous la dépendance de la pyruvate carboxylase) suivie principalement d'une réduction de l'oxaloacétate en malate.

— Carboxylation du phosphoénolpyruvate en oxaloacétate sous l'action de la phosphoénol-pyruvate-carboxylase. Cet enzyme est souvent considéré comme le principal responsable de la fixation rapide du $^{14}CO_2$ sur les acides dicarboxyliques en C_4 (Slack et Hatch, 1967 ; Carutto, Barra et Cumar, 1967) ; son rôle dans la baie a été également démontré (Meynhardt, 1965), l'oxaloacétate étant ensuite réduit en malate ;

— Carboxylation du propionylcoenzyme en méthylmalonylcoenzyme ;

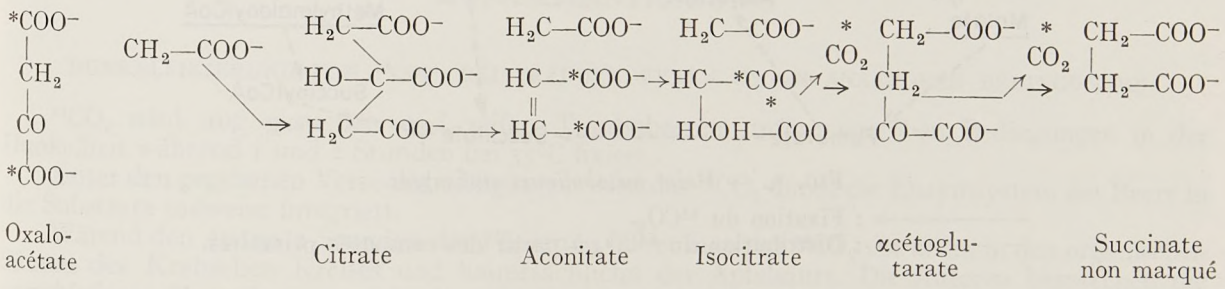
— Carboxylation du ribulose diphosphate qui donne du 3-phosphoglycérate marqué sur le carboxyle. Pyruvate, α-alanine et sérine sont alors fortement radioactifs (Meynhardt, 1965 ; Kretovitch, 1966 ; Axelrod, 1967). L'utilisation d'une telle voie semble, ici, peu probable puisque les activités retrouvées sur ces acides sont très faibles.

Distribution du ^{14}C à partir des composés primaires

Malate ou oxaloacétate étant les précurseurs, le marquage du citrate se conçoit aisément par la condensation de l'oxaloacétate avec l'acétylcoenzyme A. En revanche, le fait que le succinate possède la RS la plus élevée, tant après une heure qu'après deux heures d'incorporation de $^{14}CO_2$, demeure inexpliqué.

En effet, il est difficile d'admettre que le succinate radioactif se forme à partir du malate par la voie des réactions : malate ⇄ fumarate ⇄ succinate, puisque la RS du malate et celle du fumarate sont nettement inférieures à celle du succinate.

Le marquage du succinate n'est pas davantage compréhensible par la distribution du ^{14}C à partir du citrate, car la RS de ce dernier est beaucoup plus faible que celle du succinate. D'ailleurs, cette voie ne peut permettre l'apparition du ^{14}C dans le succinate même si, dans le cas le plus favorable l'oxaloacétate était marqué en 1 et 4. Le ^{14}C est rejeté sous forme de $^{14}CO_2$ ainsi que l'indique le schéma de réactions ci-dessous :



Il en est de même pour la suite des réactions faisant intervenir l'enzyme malique (NADP) : après décarboxylation du malate en pyruvate, celui-ci forme de l'acétate qui ; par réaction de Thunberg, donne du succinate. Si le malate est marqué en 1 ou en 4, l'acétate qui en provient par une double décarboxylation n'est pas radioactif. Seule une distribution au hasard de l'activité au cours de la réaction malate ⇄fumarate peut permettre la formation d'acétate marqué.

L'hypothèse de formation du succinate radioactif à partir de l'oxaloacétate, par la séquence de réactions :

oxaloacétate → malonate → acétate libre → acétate libre → succinate

est difficile à soutenir puisque le malonate n'a pu être mis en évidence dans ces essais.

On peut envisager que le succinate se marque, comme chez les bactéries, à la suite

d'une carboxylation du propionylcoenzyme A en méthylmalonylcoenzyme A, lui-même converti en succinylcoenzyme A (AXELROD, 1967 ; DUCET, 1968).

En outre, l'idée de la répartition du malate en compartiments dans la baie ne doit pas être rejetée. L'existence d'un tel phénomène rendrait possible le fonctionnement de certaines voies métaboliques envisagées ci-dessus : filiation malate — succinate par exemple (RANSON, 1953 ; ULRICH et LANDRY, 1956 ; WILLIAMS et PATTERSON, 1964). En effet, la faible RS du malate par rapport à celle du succinate peut s'expliquer par le fait que la radioactivité mesurée est rapportée au malate total (si tout le $^{14}CO_2$ mis en œuvre était transformé en malate marqué, ce dernier ne représenterait que 3 p. 100 environ du malate total des baies). Dans l'hypothèse d'un compartiment malate, la RS réelle de ce substrat pourrait être très supérieure à la RS mesurée.

Enfin le léger marquage de l'acide glutamique et surtout celui de l'acide aspartique semble vérifier l'existence d'une voie à faibles vitesses de réactions (COÏC, LESAINT et PROVOT, 1965) :

malate ⇄ fumarate ⇄ aspartate ou oxaloacétate ⇄ aspartate

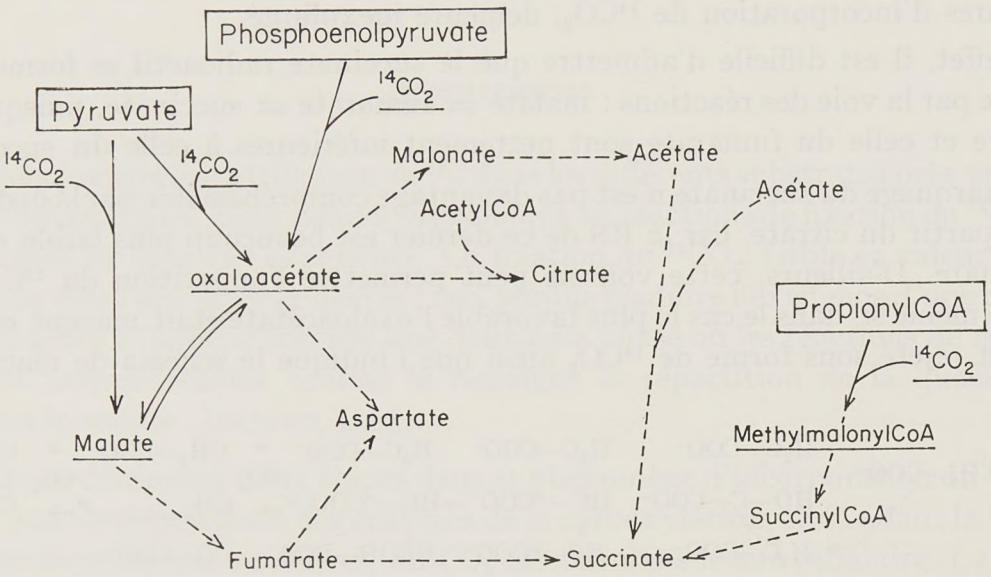


FIG. 3. — *Voies métaboliques envisagées*

——————→ : Fixation du $^{14}CO_2$.

— — — —→ : Distribution du $^{14}CO_2$ à partir des composés primaires.

CONCLUSION

Ces essais montrent qu'en anaérobiose stricte, à l'obscurité, à 35°C, le $^{14}CO_2$ dissous dans le suc cellulaire, est partiellement intégré dans les substrats par les systèmes enzymatiques de la baie de raisin. Dans les deux premières heures de l'incorporation, le ^{14}C se retrouve surtout au niveau des acides organiques du cycle de KREBS et principalement sous forme d'acide malique. De tels résultats correspondent à ceux de la littérature, relatifs à la fixation « obscure » du CO_2 dans les végétaux (MEYNHARDT, 1964 ; DRAWERT et STEFFAN, 1966 ; WAGER et COLMAN, 1967 ; YAMAGUCHI, 1967).

Cette fixation de CO_2 peut prendre une grande importance sur le plan technologique.

En effet, certains auteurs pensent que l'assimilation de CO_2 par des échanges soluble-insoluble entraîne la synthèse de protéines pouvant influencer la qualité du fruit (MEYNHARDT, 1965). D'autre part, il est possible que certains acides aminés ou peptides élaborés, participent à la formation de l'arôme caractéristique des vins obtenus par « Macération carbonique » (cette vinification utilise dans une première étape la fermentation intracellulaire des baies de raisin). Ces peptides peuvent en outre créer un milieu favorable au développement des levures alcooliques dans la deuxième étape fermentaire de ce type de vinification (FLANZY et *al.*, 1967).

Reçu pour publication en novembre 1968.

SUMMARY

FIXATION IN THE DARKNESS OF AN ANAEROBIOTIC MEDIUM, BY BERRIES OF THE GRAPE, OF THE GASEOUS $^{14}CO_2$

Some $^{14}CO_2$ is fixed on ripe and sound berries of the grape put in a dark anaerobiotic atmosphere from one to two hours at 35°C.

Under the operative conditions selected, the enzymatic systems of the berry of the grape partly integrate the $^{14}CO_2$ in the substrates.

Within two hours from such incorporation, the ^{14}C is chiefly instanced at the level of the organic acids of the Krebs' cycle, mainly malic acid. The authors then discuss the assumptions that such incorporation suggests.

Fixation of CO_2 may have great value in chemical engineering as it may be that some of the amino-acids or peptides built-up share in the bringing about of the typical aroma of the wines derived, more especially from a carbonating apparatus.

ZUSAMMENFASSUNG

DUNKELFIXIERUNG VON $^{14}CO_2$ BEI TRAUBENBEEREN UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN

$^{14}CO_2$ wird aug gesunden und reifen Traubnbeeren unter anaeroben Bedingungen in der Dunkelheit während 1 und 2 Stunden bei 35°C fixiert.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wird das $^{14}CO_2$ durch die Enzymsystem der Beere in die Substrate teilweise integriert.

Wärend den ersten 2 Stunden der Fixierung findet man das $^{14}CO_2$ vor allem in den organischen Säuren des Krebschen Kreises und hauptsächlichn der Apfelsäure. Die Autoren besprechen die verschiedenen Hypothesen, welche diese Integration aufrufen.

Technologisch kann die Fixierung von CO_2 eine bedeutende Rolle annehmen. Tatsächlich ist es móglich, dass bestimmte Aminosäuren oder elaborierte Peptide an der Bildung der charakteristischen Arome der Weine teilnehmen, welche besonders durch « kohlensaure Mazeration » gewonnen werden.

RESUMEN

FIJACIÓN EN LA OBSCURIDAD DEL $^{14}CO_2$ GASEOSO POR LAS BAYAS DE UVA EN ANAEROBIOSIS

Se procede a la fijación del $^{14}CO_2$ en las bayas de uva maduras y sanas, en situación de anaerobiosis en la obscuridad, durante 1 y 2 horas, a una temperatura de 35°C.

En las condiciones operativas adoptadas, el $^{14}CO_2$ queda parcialmente integrado en los substratos por los sistemas enzimaticos de la baya de uva.

En las dos primeras horas de la incorporación, el ^{14}C se encuentra, sobre todo, al nivel de los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs y principalmente del ácido málico. Los autores discuten las hipótesis sugeridas por semejante incorporación.

La fijación del CO_2 puede llegar a tomar una gran importancia en tecnologia, ya que, efectivamente, es posible que ciertos ácidos o péptidos elaborados participen en la formación del aroma característico de los vinos obtenidos en particular por « maceración carbónica ».

RIASSUNTO

FISSAZIONE ALL'OSCURITÁ DEL $^{14}CO_2$ GASSOSO DA PARTE DELLE BACCHE DI UVA IN ANEROBIA

Del $^{14}CO_2$ è fissato su delle bacche di uva mature e sane poste in anerobia all'oscurità durant 1 a 2 ore a 35°C.

Nelle condizioni operatorie adottate, il $^{14}CO_2$ è parzialmente integrato nei substrati dai sistem enzimatici della bacca d'uva.

Nelle prime 2 ore dell'incorporazione, il ^{14}C si ritrova sopratutto al livello degli acidi organic del ciclo di Krebs e principalmente dell'acido malico. Gli autori discutono delle ipotesi che quest incorporazione suggerise.

La fissazione del CO_2 puo prendere una grande importanza in tecnologie. È, infatti, possibil che certi acidi aminici o peptidi elaborati partecipino alla formazione dell'aroma caratteristico d vini ottenuti in particolare per « macerazione carbonica ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AXELROD B., GREENBERG D. M., 1967. *Metabolic pathways*, **1**, 283-284.

CARUTTO R., BARRA S. H., CUMAR F. A., 1967. Carbohydrate metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 3 211-246.

COÏC Y., LESAINT C., PROVOT M., 1965. L'incorporation à l'obscurité, à la lumière et à des temps diff rents de $^{14}CO_2$ dans les acides organiques des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum*. Influence de la tem pérature. *Ann. Physiol. vég.*, **7**, 47-56.

DESVEAUX R., IOGANE CHARLES M., 1955. Étude sur la germination des graines oléagineuses. *An agron.*, **2**, 337-361.

DRAWERT F., STEFFAN H., 1966. Biochemish physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. *Viti* **5**, 377-384.

DUCET G . Cours 1968.

FAUCONNEAU G., PION R., 1965. Communication personnelle.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiqu stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. I fluence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-107.

JOLIVET E., 1963. L'action de la « rindite » sur l'évolution des acides organiques dans diverses parties d tubercule de Pomme de Terre. *C. R. Acad. Sci*, ; Paris, **257**, 747-750.

KRETOVITCH V. L., 1966. *Princ. of Plant Bioch.* 281.

MEYNHARDT J. T., *a* 1963. Assimilation of ^{14}C labelled carbon dioxide by *Barlinka* grape berries. *Natio Conf. Nuclear Energy, S. Afr.*, 456-463.

MEYNHARDT J. T., *b* 1965. Biosynthesis of dicarboxylic acids through carbon dioxide fixation by an enzym extract from *Barlinka* grape berries. *S. Afr. J. agric. Sci.*, **8**, 381-392.

RANSON S. L., 1953. Zymasis and metabolism of acids in the higher plants. *Nature*, **252**.

ROUX L., LESAINT C., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques ch les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, **1**, 83-92.

SLACK C. H., HATCH M. D., 1967. Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzym in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. *Biochem* **103**, 660-665.

ULRICH R., LANDRY J., 1956. Formation d'acides organiques dans les fruits conservés en atmosphère riche en gaz carbonique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 2757-2759.

WAGER G. H., 1967. The incorporation of $^{14}CO_2$ into Green pas in the dark. *J. exper. Bot.*, **18**, 672-691.

COLMAN B., WAGER G. H., 1967. The labelling of malic and citric acids of pea leaves and cotyledons of germinating peas by $^{14}CO_2$ in the dark. *J. exper. Bot.*, **18**, 692-694.

WALKER D. A., 1962. Pyruvate carboxylation and Plant metabolism. *Biol. Rev.*, **37**, 215-256.

WILLIAMS N. W., PATTERSON M. E., 1964. Non volatile organic acids and core breakdown of bartlett pears. *Agric. Food Chem.*, **12**, 80-83.

YAMAGUCHI M., HOWARD F. D., HUGUES D. L., THOMPSON R. H., 1967. Carbon dioxide in pepper fruits : its utilization and effect on respiration. *Amer. Soc. hortic. Sci.*, **91**, 428-435.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 299-313.

CORRÉLATIONS ENTRE LA CONSTITUTION EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES VINS, LA TEMPÉRATURE DE VINIFICATION ET LES CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE L'ANNÉE

C. POUX, S. AUBERT
avec la collaboration technique de R. JOUBERT

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

On a étudié les variations quantitatives et qualitatives de composition en composés phénoliques (colorants et tannoïdes) des vins de la même origine en fonction de la température de vinification et des caractéristiques de la vendange liées aux conditions de l'année.

INTRODUCTION

L'influence de la température de vinification sur la composition des vins en composés phénoliques a intéressé de nombreux auteurs, avec des objectifs différents. Ainsi, on a utilisé depuis longtemps le phénomène d'augmentation de la couleur des vins en opérant à des températures de fermentation, ou de macération, plus élevées. Actuellement se développe une tendance à vinifier à plus basse température, afin d'éviter certains inconvénients comme les arrêts de fermentation ou la perte de substances aromatiques des vins.

Dans la région méridionale française, les vinifications de vins rouges de consommation courante sont, en général, naturellement conduites entre les températures de 25° et 35°, ceci en raison de nombreux facteurs, dont les principaux sont : la température d'entrée de la vendange directement sous l'influence des conditions météorologiques, la possibilité de dissipation de la chaleur accumulée dans les

récipients dans lesquels s'effectue la fermentation. C'est la raison qui nous a amené conduire, durant plusieurs années consécutives, des vinifications expérimentales, l'aide d'une vendange issue d'une même parcelle et d'un même cépage (*Carignan* à deux températures fixées de 25° et 35°, afin de limiter le plus possible le nombre paramètres pouvant intervenir dans le déroulement du phénomène de fermentation-macération d'un vin rouge, que nous nous proposions d'observer.

Au fur et à mesure que s'enregistraient les observations, il nous est apparu que niveau de dissolution des matières polyphénoliques était fonction non seulement la température, mais aussi d'autres facteurs, ce à quoi il fallait s'attendre. *A pri* d'ailleurs, on admet assez généralement que le facteur principal est constitué par richesse potentielle de chaque vendange en ces substances.

L'évaluation de cette richesse pouvait, en première approximation, être recherchée en tentant de réaliser une extraction totale des composés polyphénoliques raisin. C'est ce qui a été effectué au cours de la récolte 1967, dans un autre trava (Poux, Aubert, 1968), pour le cépage *Carignan noir*. On a pu ainsi confronter résultats d'une extraction totale des constituants phénoliques du raisin, avec ceu des extractions de certains de ces composés effectuées au cours de l'élaboration vins provenant des mêmes raisins.

Nous avons trouvé un rendement de récupération faible, de l'ordre de 25 p. 1 pour les colorants rouges et après 7 jours de cuvaison à 25°C. Le gain de coule apporté par une augmentation de la température de vinification de 25°C à 35°C e de 2 p. 100, soit 8 p. 100 en valeur relative entre les deux vins dans les conditio expérimentées.

Ainsi donc, le gain relativement faible de l'extraction de la matière premiè laisse supposer que les variations qualitatives de composition dans la diffusion polyphénols, colorants ou tannoïdes, sont peu sensibles lorsque les vins diffère uniquement par 10°C de température de vinification.

D'après ces résultats, sur l'estimation des polyphénols de la matière première l'année 1967 uniquement, nous avons pensé que la richesse potentielle de la vendan était en relation avec le niveau d'extraction le plus élevé atteint par le vin, c'est-à-di en fait, avec les vins vinifiés à des températures les plus élevées de 35°.

Dans notre expérimentation, pendant neuf années consécutives, nous avo comparé les différences de couleur et de composés phénoliques totaux des vins é borés à 25° et 35°C, les autres conditions de vinification étant voisines. Plus partic lièrement, on a étudié les possibilités de corrélation entre l'augmentation de pol phénols entraînée par l'écart constant de 10°C sur la température de vinification les teneurs des vins, soit à 35°, soit à 25° ; ceci sur les neuf essais réalisés sur d récoltes différentes sur le plan climatique.

D'autre part, nous avons suivi les variations relatives des divers indices de pol phénols : colorants rouges, jaunes et tannoïdes totaux, d'une année à l'autre et ent les deux températures de vinification choisies.

Ensuite, nous avons cherché si l'on pouvait établir des liens entre la teneur composés phénoliques des vins et d'autres caractéristiques de la vendange : poi de la baie, teneur en sucre, acidité.

Il est bien évident qu'une meilleure connaissance de ces diverses relations pe mettra une prévision plus sûre et une adaptation plus correcte de la technologie à qualité de la matière première.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE ET MATÉRIEL UTILISÉ

La vendange provient chaque année de la même parcelle de vigne de *Carignan noir* du Domaine expérimental de Pech-Rouge (Aude).

Ce vignoble est conduit tous les ans sensiblement dans les mêmes conditions et dans une région où la vendange arrive normalement à maturité complète en fin septembre ; la matière première de notre expérimentation sera au point de vue qualitatif essentiellement fonction des conditions climatiques.

Les caractéristiques climatiques de l'année sont traduites par les températures moyennes au cours des mois de juillet, août et septembre, ainsi que par la pluviosité générale pendant la période mars à septembre. On rapprochera ces données de la grosseur des raisins (poids de 100 baies), de l'acidité et de la teneur en sucre du moût correspondant, ou plus exactement du rapport Sucre/Poids, lorsque les baies atteignent leur maximum de poids (C. POUX, 1950).

On prélève dans la mesure du possible le raisin sain et on vinifie en bonbonnes de 15 litres sur environ 10 kg de vendange entière ; deux microvinifications à 25° et 35° sont faites tous les ans dans des conditions comparables de cuvaison.

La matière première est identique dans les deux bonbonnes par une répartition égale du liquide et des parties solides après pesée. Le moût homogène a été sulfité à raison de 50 mg de métabisulfite de potassium par litre. Un levurage est fait pour tous les moûts avec une même souche (*Saccharomyces ellipsoïdeus* « Limoux-8 »). En cours de cuvaison, le chapeau de marc est maintenu constamment immergé par une palette perforée en bois.

Le premier soutirage des vins est effectué lorsqu'ils ont atteint une densité inférieure à 1 000, après quatre à huit jours de macération ; en général, on constate que les vins élaborés à 35° sont terminés un à deux jours avant ceux à 25°. Les vins ont évolué en cave à 15°C pendant un à cinq mois avant le contrôle de leur richesse finale en composés phénoliques.

Aucune addition d'anhydride sulfureux n'est faite sur les vins finis.

L'absorption spectrophotométrique des colorants a été mesurée après dilution du vin au 1/5 dans le milieu éthanol-eau (50-50) dans une cuve de 10 mm. Pour les chromophores absorbants dans l'ultraviolet, la mesure est faite après dilution au 1/50 dans le même solvant éthanol-eau (50-50) dans une cuve en quartz de 10 mm. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Jobin et Yvon, modèle Maroc.

Les colorants rouges du vin sont évalués par un indice d'anthocyanes représenté par le maximum d'absorption dans la zone 520-550 nm dans le visible; les chromophores jaunes par le minimum dans la zone 420-430 nm.

L'indice de matières tannoïdes est exprimé par l'absorption caractéristique en UV dans la zone 275-280 nm (M. FLANZY et C. POUX, 1958).

RÉSULTATS

Le tableau 1 rassemble les caractéristiques générales de l'année, c'est-à-dire ; les conditions climatiques (pluviosité et température), le rendement de la récolte représenté par le poids moyen de 100 baies lorsqu'elles atteignent leur poids maximum avec leur teneur en sucre (ou S/P) et leur acidité de titration. La durée de cuvaison indique le temps de contact matières solides - liquide et les écarts, par rapport aux valeurs moyennes, nous renseignent sur l'enrichissement du vin en polyphénols par macération plus ou moins prolongée.

Le tableau 2 nous donne les résultats obtenus sur les microvinifications à 25° et 35°. L'élévation de température de 10°C entraîne une augmentation variable de la couleur ou de la teneur en matières tannoïdes. Nous rapportons les pourcentages d'enrichissement des trois indices de polyphénols en fonction des teneurs des vins à 35°. Les mêmes calculs effectués sur la base de la teneur des vins à 25° n'ont pas apporté plus de clarté à notre discussion et nous ne les avons pas mentionnés.

TABLEAU I

Caractéristique de la vendange

Année	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	Moyenne
Date de la vendange.....	30 sept.	20 sept.	22 sept.	20 sept.	1er oct.	22 sept.	5 oct.	21 sept.	26 sept.	
Pluviosité (caractéristique générale de mars à septembre)	très humide	normale	très sèche	normale	humide	normale	normale	normale	très sèche	
Moyenne des températures (Maxima + Minima)										
Juillet	25°7	22°08	23°77	22°17	25°70	24°65	21°81	20°25	24°10	23°36
Août	23°51	21°58	23°22	24°02	20°52	21°90	22°11	20°84	22°90	22°29
Septembre	21°6	19°51	20°25	20°2	17°6	20°18	17°30	19°95	29°59	19°58
Moyenne	23°6	21°2	22°4	22°1	21°3	22°2	20°4	20°3	22°2	21°75
Poids de 100 baies en g (au maximum)...	272	279	187	257	251	254	250	255	208	246
S/P (Sucres/Poids).....	0,175	0,183	0,168	0,180	0,147	0,164	0,168	0,178	0,175	0,171
Acidité totale (exprimée en SO_4H_2/litre).	5,2	5,3	3,8	5,2	5,85	4,35	5,1	5,0	4,4	4,91
Cuvaison (en jours) 25°	7	8	6	6	8	6	8	6	8	7
Cuvaison (en jours) 35°	6	7	5	5	8	4	6	5	7	6

TABLEAU 2

Indices de composés phénoliques des vins

Année de vinification	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	Moyenne
Date de contrôle	janv. 60	déc. 60	nov. 61	nov. 62	mars 64	oct. 64	janv. 66	déc. 66	oct. 67	
Colorants rouges (DO 530 nm)										
35°	0,555	0,915	0,490	1,060	0,488	0,565	1,040	1,200	0,705	0,780
25°	0,435	0,680	0,420	0,760	0,355	0,480	0,920	0,810	0,615	0,609
Différence	0,120	0,235	0,070	0,300	0,133	0,085	0,120	0,390	0,090	0,171
Pourcentage par rapport à 35°	21,6 %	25,6 %	14,3 %	28,3 %	27,2 %	15,0 %	11,5 %	32,5 %	12,8 %	21,9 %
Colorants jaunes (DO 430 nm)										
35°	0,425	0,670	0,378	0,730	0,400	0,403	0,770	0,840	0,405	0,558
25°	0,330	0,475	0,347	0,530	0,290	0,344	0,650	0,555	0,350	0,430
Différence	0,095	0,195	0,031	0,200	0,110	0,059	0,120	0,285	0,056	0,128
Pourcentage par rapport à 35°	22,4 %	29,1 %	8,2 %	27,4 %	27,5 %	14,6 %	15,6 %	33,9 %	13,8 %	22,9 %
Matières tannoïdes (DO 280 nm)										
35°	0,790	1,000	0,885	0,975	0,649	0,750	0,908	0,940	1,050	0,883
25°	0,670	0,800	0,798	0,808	0,549	0,668	0,845	0,770	0,890	0,755
Différence	0,120	0,200	0,087	0,167	0,100	0,082	0,063	0,170	0,160	0,128
Pourcentage par rapport à 35°	15,2 %	20,0 %	9,8 %	17,1 %	15,4 %	10,9 %	6,9 %	18,1 %	15,2 %	14,5 %

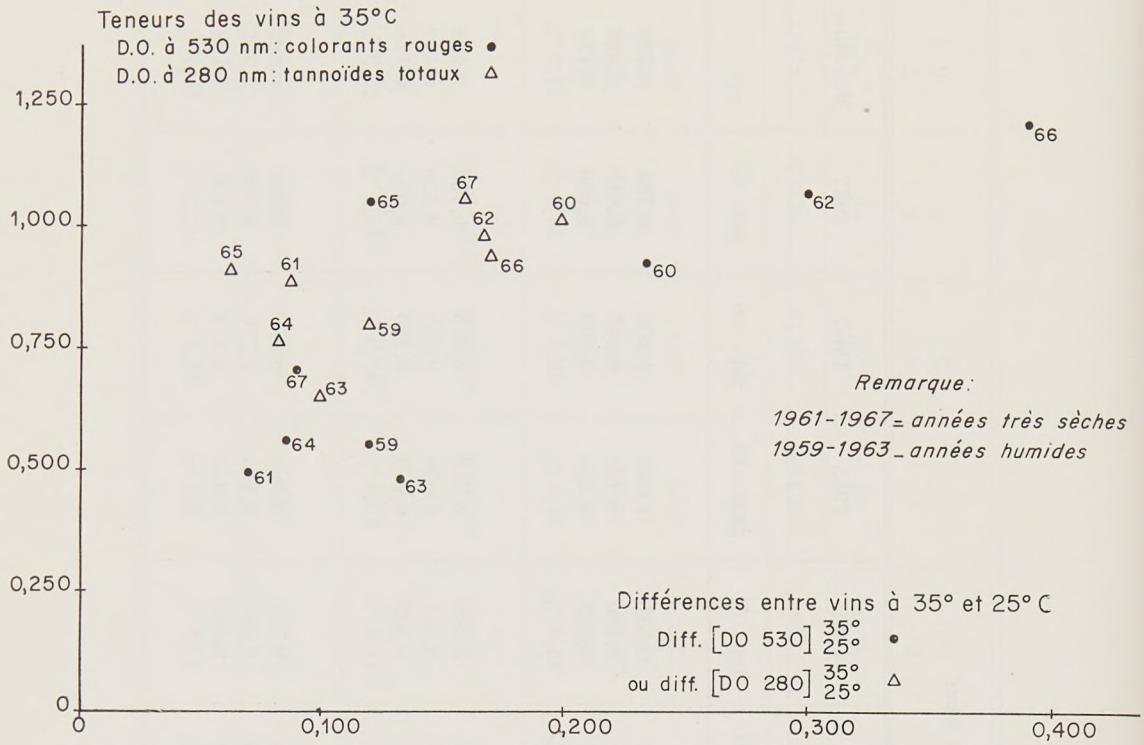


FIG. 1. — *Corrélations : gains en polyphénols pour + 10°C et teneurs des vins à 35°C*

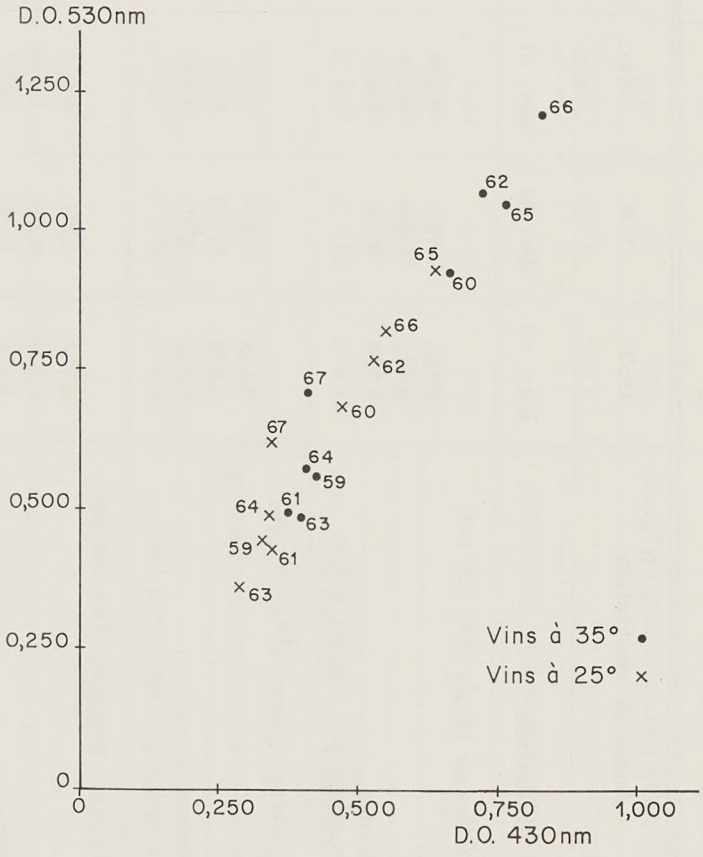


FIG. 2. — *Corrélation : chromophores rouges et chromophores jaunes*

La figure 1 rassemble deux diagrammes de dispersion des valeurs des gains en couleur et en matières tannoïdes totales pour une élévation de température de vinification de 10°C, par rapport aux teneurs des vins obtenus à 35°. La dispersion ne serait pas réduite si l'on prenait en ordonnées les valeurs des vins obtenus à 25°.

La figure 2 traduit une très bonne corrélation entre l'indice de matières colorantes rouges (530 nm) et l'indice de chromophores jaunes (430 nm) pour l'ensemble des vins à 25° et 35°.

La figure 3 montre une corrélation plus approximative mais positive entre l'indice de matières colorantes rouges et celui des matières tannoïdes totales ; ceci pour les vins obtenus à 35° comme pour ceux à 25°.

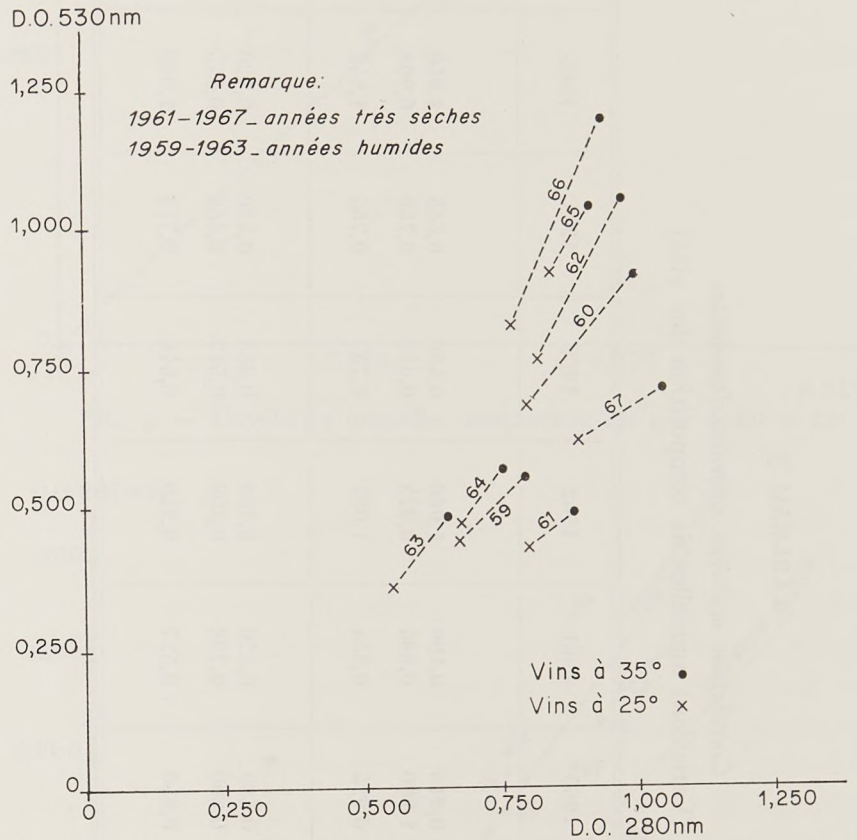


FIG. 3. — *Corrélation : matières colorantes rouges et matières tannoïdes totales*

Toutefois, pour l'ensemble des points, on observe que la composition des vins est essentiellement fonction de l'année.

Le tableau 3 chiffre les variations relatives des indices de polyphénols, colorants rouges et tannoïdes, des vins obtenus à 35° ou 25°. On peut admettre que ce rapport arbitraire des données spectrophotométriques relevées : matières colorantes rouges/ matières tannoïdes totales, ou DO 530/DO 280 (sans tenir compte de la dilution et du solvant dans les deux mesures), représente un indice de composition ou de qualité des vins.

La figure 4 est la transposition du tableau précédent sous forme de diagramme avec pour ordonnées les deux compositions à 25° et 35° pour les vins d'une même année et d'une même vendange. La corrélation satisfaisante entre les deux séries de valeurs confirme sur neuf années que la différence de 10°C sur la température de vinification influe peu par rapport aux variations de composition des vins dues aux conditions de l'année.

TABLEAU 3

Corrélation matières colorantes/tannoïdes
(Variations annuelles de composition des vins)

Année	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	Moyenne
Vinification à 35°										
(DO 530 nm)	0,555	0,915	0,490	1,060	0,488	0,565	1,040	1,200	0,705	0,780
(DO 280 nm)	0,790	1,000	0,885	0,975	0,649	0,750	0,908	0,940	1,050	0,883
Rapport $\frac{530}{280}$ = R 35°	0,702	0,915	0,554	1,087	0,752	0,754	1,145	1,278	0,671	0,880
Vinification à 25°										
(DO 530 nm)	0,435	0,680	0,420	0,760	0,355	0,480	0,920	0,810	0,615	0,609
(DO 280 nm)	0,670	0,800	0,798	0,808	0,549	0,668	0,845	0,770	0,890	0,755
Rapport $\frac{530}{280}$ = R 25°	0,650	0,850	0,527	0,940	0,646	0,718	1,090	1,050	0,691	0,806

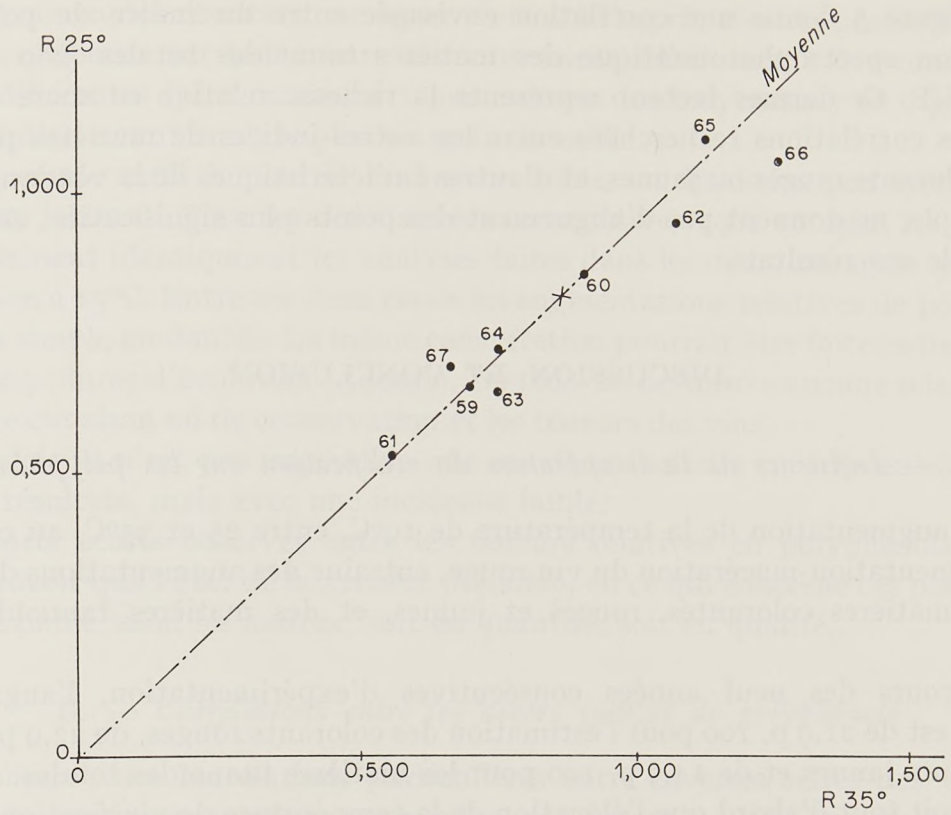


FIG. 4. — *Corrélation annuelle : composition des vins à 35° et 25°*

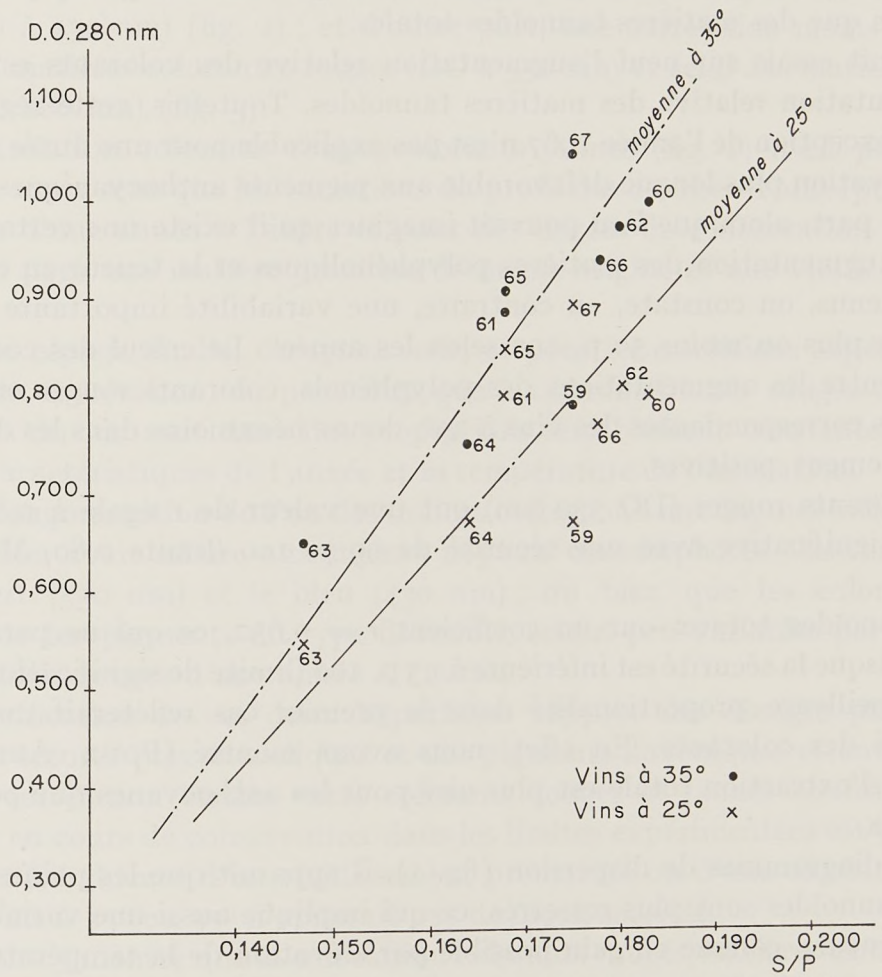


FIG. 5. — *Corrélation : matières tannoïdes totales et rapport S/P*

La figure 5 donne une corrélation envisagée entre un indice de polyphénols, l'absorption spectrophotométrique des matières tannoïdes totales (280 nm) et le rapport S/P. Ce dernier facteur représente la richesse relative en sucre (C. POUX, 1950). Les corrélations recherchées entre les autres indices de matières polyphénoliques, colorants rouges ou jaunes, et d'autres caractéristiques de la vendange, acidité par exemple, ne donnent pas d'alignement des points plus significatifs ; elles ont été écartées de ces résultats.

DISCUSSION ET CONCLUSION

A. — *Influence de la température de vinification sur les polyphénols*

Une augmentation de la température de 10°C, entre 25 et 35°C, au cours de la phase fermentation-macération du vin rouge, entraîne des augmentations de l'extraction des matières colorantes, rouges et jaunes, et des matières tannoïdes totales (tabl. 2).

Au cours des neuf années consécutives d'expérimentation, l'augmentation moyenne est de 21,9 p. 100 pour l'estimation des colorants rouges, de 22,9 p. 100 pour les colorants jaunes et de 14,5 p. 100 pour les matières tannoïdes totales.

On voit tout d'abord que l'élévation de la température de vinification provoque en moyenne sur l'ensemble des échantillons une augmentation qui est plus en faveur des colorants que des matières tannoïdes totales.

Dans huit essais sur neuf l'augmentation relative des colorants est plus forte que l'augmentation relative des matières tannoïdes. Toutefois, cette règle n'est pas absolue et l'exception de l'année 1967 n'est pas explicable pour une durée de cuvaison ou de conservation plus longue défavorable aux pigments anthocyaniques.

D'autre part, alors que l'on pouvait imaginer qu'il existe une certaine relation entre cette augmentation des matières polyphénoliques et la teneur en ces matières des vins obtenus, on constate, au contraire, une variabilité importante autour des moyennes de plus ou moins 50 p. 100 selon les années. Le calcul des coefficients de corrélation entre les augmentations des polyphénols, colorants rouges et tannoïdes, et les teneurs correspondantes des vins à 35°, donne néanmoins dans les deux cas des valeurs nettement positives.

Les colorants rouges (DO 530 nm) ont une valeur de r égale à 0,81, soit une corrélation significative avec une sécurité de 99 p. 100 (limite 0,80, M. LAMOTTE, 1957).

Les tannoïdes totaux ont un coefficient $r = 0{,}632$, ce qui ne permet pas de conclure, puisque la sécurité est inférieure à 95 p. 100 (limite de signification $r = 0{,}67$).

Cette meilleure proportionalité dans le premier cas refléterait une meilleure extractibilité des colorants. En effet, nous avons montré (POUX, AUBERT, 1968) que le bilan d'extraction totale est plus aisé pour les anthocyanes que pour les tannoïdes totaux.

Sur les diagrammes de dispersion (fig. 1), il apparaît que les points correspondants aux tannoïdes sont plus resserrés, ce qui implique aussi une variabilité moins grande en teneurs, comme en gain possible par élévation de la température de vinification.

De l'examen des résultats une réserve vient à l'esprit, c'est la possibilité que les différences obtenues sur les teneurs des vins soient dues : soit à des conditions de cuvaison différentes (plus ou moins 1 jour autour des moyennes 7 et 6 jours), soit à une évolution avant analyse plus ou moins sensible.

Un exemple suffit à montrer l'influence faible, ou du moins peu systématique, de ces deux facteurs. Pour les deux années consécutives 1961 et 1962, les cuvaisons sont absolument identiques et les analyses faites dans les deux cas après 40 jours de conservation à 15°C. Entre ces deux essais les augmentations relatives de polyphénols varient du simple au double. La même constatation pourrait être faite entre les essais 1960 et 1965 (durée d'évolution 95 jours). De plus, on ne trouve aucune relation entre la durée de cuvaison ou de conservation et les teneurs des vins.

Toutefois, il n'est pas impossible que ces deux facteurs contribuent à la variabilité des résultats, mais avec une incidence faible.

Les forts écarts observés entre les teneurs relatives en polyphénols des vins laissent prévoir que l'état de la matière première, en ce qui concerne ces polyphénols, est très variable selon les années ; soit en quantité, soit en qualité.

B. — *Corrélations entre les divers indices de polyphénols*

On observe des corrélations particulières entre diverses séries des valeurs de l'absorption spectrophotométrique pour les vins obtenus à 35°C comme pour ceux à 25°C. D'une part, celle des colorants rouges (DO à 530 nm) et des chromophores jaunes (DO à 430 nm) (fig. 2) ; et d'autre part, une corrélation moins bonne entre l'indice des matières colorantes rouges (DO à 530 nm) et celui des matières tannoïdes totales (DO 280 nm) (fig. 3).

La corrélation colorants rouges/colorants jaunes (fig. 2) n'est pas pour nous surprendre, en ce sens que les variations du profil des courbes d'absorption de la couleur du vin d'une année à l'autre et pour des durées de conservation voisines sont faibles, ceci pour une matière première de même origine et une vinification comparable.

Pour le cépage étudié, *Carignan noir*, et pour les conditions expérimentales de fermentation-macération, on peut dire que les chromophores rouges et jaunes des polyphénols du vin sont dans des proportions sensiblement constantes quelles que soient les caractéristiques de l'année et la température de vinification.

A une augmentation de l'un des indices correspond une augmentation de l'autre ; comme si l'on avait affaire aux mêmes noyaux chromophores absorbants à la fois dans le vert (530 nm) et le bleu (430 nm) ; ou bien que les colorants jaunes, par exemple les pigments du type flavonols, soient peu variables par rapport aux anthocyanidols rouges d'une année à l'autre.

La vérification de ces deux hypothèses suppose des dosages plus précis des diverses structures polyphénoliques et des pigments flavoniques et anthocyaniques.

Cette corrélation étroite entre colorants rouges et jaunes confirme aussi que l'évolution en cours de conservation dans les limites expérimentées est pratiquement négligeable. L'influence d'un vieillissement prématuré ou d'une oxydation préférentielle des vins à 25° ou 35° n'apparaît pas de façon sensible.

La figure 3 montre que la corrélation colorants rouges/matières tannoïdes totales est plus fluctuante. Une meilleure constance dans ce rapport de deux indices de poly-

phénols distincts supposerait une diffusion qualitativement identique des polyphénols pendant la phase fermentation-macération, à 25° comme à 35°, et indépendante de la qualité de la vendange. La composition relative du vin en polyphénols serait alors identique d'une année à l'autre, seule l'extractibilité maximale ou la richesse potentielle du raisin serait différente.

Le calcul des coefficients de corrélation entre les indices de DO à 530 nm et de DO à 280 nm, pour les deux séries de vins à 25° et 35°, montre que ces deux indices sont dépendants. Pour les vins à 35°, on trouve : $r = 0{,}615$, pour les vins à 25°C : $r = 0{,}674$. La limite de signification est de 0,67 pour une sécurité supérieure à 95 p. 100. Or, on sait que les anthocyanes absorbants à 530 nm absorbent également à 280 nm (Timberlake et Bridle, 1967). On aurait pu espérer une meilleure corrélation si ces polyphénols étaient du même type pour un même cépage et d'une année à l'autre. La variabilité considérable du rapport $\frac{\text{DO 530 nm}}{\text{DO 280 nm}}$ montre bien que la diffusion des polyphénols, colorants et tannoïdes, diffère bien qualitativement en fonction des conditions annuelles.

Le tableau 3 et la figure 4 correspondante, permettent de montrer, par contre, une corrélation assez étroite entre la composition des vins à 25° et à 35° pour une même année ; ce qui signifie que pour une matière première identique la composition exprimée par le rapport colorants rouges/matières tannoïdes totales diffère peu avec la température de vinification, alors que ce rapport varie fortement d'une année à l'autre et peut constituer une caractéristique de la récolte.

C. — *Influence des conditions climatiques*

Il faut souligner que l'effet de l'augmentation de température de vinification sur la composition des vins n'est pas rigoureusement identique selon les années, ce qui peut expliquer les conclusions négatives sur les corrélations déjà envisagées.

Sur la figure 3, si on relie les points représentant les vins d'une même année, on constate que les pentes de la plupart des droites sont sensiblement parallèles, de nombreux points sont relativement bien alignés ; pour ces vins la composition varierait dans des limites assez restreintes, indépendamment de la richesse totale en polyphénols. On peut néanmoins séparer divers groupes de points et de droites. Deux années se distinguent particulièrement : 1961 et 1967 ; elles correspondent à deux années de grande sécheresse où certains métabolismes de la vigne ont été perturbés (poids du grain et acidité faibles). Une augmentation de 10°C de la température de vinification (25° à 35°) entraîne, dans ces deux cas, une augmentation relative en matières tannoïdes forte par rapport à l'enrichissement en colorants rouges ; ce qui est l'inverse pour les autres années et plus particulièrement 1960, 1962, 1966 où les grains sont gros, riches en sucres et d'acidité supérieure à la moyenne. Sur le plan pratique cela se traduit pour ces trois « bonnes » années par un gain très appréciable de couleur (25,6 p. 100, 28,3 p. 100 et 32,5 p. 100) lorsque la température de vinification est plus élevée. Alors que les années de sécheresse le gain de couleur possible est faible (14, 3 p. 100 et 12,8 p. 100) pour la même augmentation de température.

De même, il faut remarquer que les années 1959 et 1963, qui sont quantitativement les moins riches en polyphénols, correspondent à deux périodes particulièrement humides.

On retrouve dans les figures 1, 2, 3 et 4 de façon plus ou moins nette, ces familles de points correspondant à des années de conditions climatiques particulières.

Une autre hypothèse émise est l'existence d'une corrélation entre la teneur en polyphénols et la teneur en sucres du raisin, cette relation peut cependant être faussée après vinification. En effet, la corrélation entre matières tannoïdes des vins (indice à 280 nm) et le rapport S/P, caractéristiques du cépage (C. Poux, 1950) qui varie entre des limites qui dépendent des conditions météorologiques de l'année, est assez grossière, à 25°C comme à 35°C, mais elle est néanmoins positive (fig. 5).

Le calcul des coefficients de corrélation est en faveur des vins vinifiés à 35° ($r = 0{,}830$ pour 35° et $r = 0{,}700$ à 25° avec une sécurité de 99 p. 100 et 95 p. 100 respectivement) ; on peut supposer que la corrélation serait encore meilleure après extraction totale des polyphénols du raisin.

Tout se passerait donc comme s'il existait un certain synchronisme ou une filiation entre les métabolismes glucidiques et polyphénoliques ; ce qui est en accord avec les données récentes de la biochimie végétale (A. C. Neish, 1964).

D'autre part, de façon très générale, on peut aussi relever une périodicité bisannuelle des caractéristiques du raisin, ainsi que de la couleur des vins, mais avec une exception (1965). Ces cycles seraient-ils en liaison avec la constitution des réserves du cep ? ou bien s'agit-il d'une simple coïncidence ?

CONCLUSION

En conclusion pratique à toutes ces observations, il faut retenir les différences très importantes dans la composition des vins issus d'un même cépage et d'une même parcelle. Les rapports d'indices de composés phénoliques montrent que les proportions respectives de matières colorantes et de matières tannoïdes totales varient surtout de façon très appréciable avec les conditions météorologiques de l'année et à un degré moindre avec l'influence de la température de vinification.

Il apparaît que le résultat sera essentiellement fonction de la qualité de la matière première et aucune règle absolue de vinification ne peut être donnée. Toutefois, on peut penser que, pour augmenter la couleur des vins, il faut conseiller d'élever la température de vinification les années où la récolte est abondante et les conditions climatiques favorables. Par contre, les années de forte sécheresse, ou dans le cas de perturbation des conditions de maturité habituelle du raisin, il semble que ce traitement soit discutable, sans oublier d'ailleurs les réserves que cette pratique impose sur le plan des arômes, des saveurs et de la conduite des vinifications à des températures relativement élevées.

Sur un plan encore plus général, les conclusions précédentes vont à l'appui du souhait des œnologues d'un équipement de régulation thermique des caves. En effet, les années de grande sécheresse correspondent généralement dans les régions méridionales aux années de forte chaleur, d'où le double intérêt d'un léger refroidissement de la fermentation. Les températures de vinification hautes apporteront, dans ce cas, un faible gain de couleur et, par contre, les vins risquent d'être particulièrement riches en tannoïdes astringents.

Reçu pour publication en octobre 1968.

SUMMARY

CORRELATIONS BETWEEN THE STRUCTURE OF A PHENOLIC COMPOUND IN WINES, THE VINIFICATION TEMPERATURE AND THE GENERAL CHARACTERISTICS OF THE VINTAGE

For a single variety and the selfsame vineyard plot from which a wine originated, an increa of 10°C in the vinification temperature involves a relative enrichment in phenolic compounds, whi is not proportional to the maximum content of the wine and cannot, therefore, be formulated exac from year to year.

The colour of the wine (red chromophores at 530 nm and yellow chromophores at 430 nm) do not vary appreciably with the vinification temperature or the seasonal conditions.

The position is rather that the composition of the wine, in regard to its content of polyphen substances, such as red colouring (index-280 nm), is essentially a function of the meteorologi conditions of the particular year and, in consequence, of the quality of the vintage.

At the same time there are important correlations between one of these indices and the gene characteristics of the grape, in particular the sugar/weight ratio of the berries.

RESUMEN

CORRELACIONES ENTRE LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS, LA TEMPERATURA DE VINIFICACION Y LAS CARACTERISTICAS GENERALES DEL ANO

Para un mismo tipo de cepa y une misma parcela de viña, un aumento de la temperatura vinificación de 10°C acarrea un enriquecimiento relativo en compuestos fenólicos no proporcion al contenido máximo del vino y por lo cual no puede llegar a ser formulable de un año a otro.

La tonalidad de un vino (cromoforos rojos a 530 nm y amarillos a 430 nm) no varía de for apreciable con la temperatura de vinificación y las condiciones anuales.

Por el contrario, la composición del vino en materias polifenólicas del tipo : colorantes ro (índice a 530 nm) y tanoides totales (índice a 280 nm) se encuentra en relación virtualmente con condiciones meteorológicas del año y. por consiguiente, de la calidad de la vendimia.

Del mismo modo, también existen correlaciones interesantes entre uno de estos índices y características generales de la uva, y más particularmente con la relación Azúcar/Peso del grano uva.

RASSIUNTO

CORRELAZIONE TRA LA COMPOSIZIONE IN COMPOSTI FENOLICI DEI VINI, LA TEMPERATURA DI VINIFICAZIONE E LE CARATTERISTICHE GENERALI DELL'ANNATA

Per uno stesso vitigno ed una stessa particella di vigneto, un aumento di temperatura di vi ficazione di 10°C produce un arricchimento relativo in composti fenolici non proporzionale al ten massimo del vino e, per cio non formulabile da un anno all'altro.

La tinta d'un vino (cromofori rossi a 630 nm e gialli a 430 nm) non varia sensibilmente con temperatura di vinificazione e le condizioni annuali.

Per contro, la composizione del vino in materia polifenoliche del tipo : coloranti rossi (indice 530 nm) e tannoidi totali (indice a 280 nm) è essenzialmmente funzione delle condizioni meteoro giche dell'annata e, quindi, della qualità della vendemmia.

Come pure esisteno delle correlazioni interessanti tra l'uno di questi indici e le caratteristic generali dell'uva, piu particolarmente col rapporto Zucchero/Peso delle bacche o acini.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FLANZY M., POUX C., 1958. Les possibilités de la microvinification. Application à l'étude de la macération. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 377-401.

NEISH A. C., 1964. *Major pathways of biosynthesis of phenols in Biochemistry of phenolic compounds*, 295-360 Ed. J. B. Harborne, Acad. Press. London and New York.

LAMOTTE M., 1957. *Initiation aux méthodes statistiques en biologie*, Masson et C^ie^, Éd., Paris.

POUX C., 1950. Relation entre le poids des sucres et le poids de matière fraîche dans les raisins de différentes variétés de *Vitis vinifera* au moment de la maturité. *C. R. Acad. Agric.*, **36**, 605-607.

POUX C., 1955. Une constante physiologique dans deux variétés de fruits de *Vitis vinifera*. *C. R. Acad. Agric.*, **41**, 422-425.

POUX C., AUBERT S., 1968. Extraction totale des polyphénols du raisin. *Ann. Technol. agric.* (à paraître).

TIMBERLAKE C. F., BRIDLE P., 1966. Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. *Nature*, **212**, 158-159.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 315-332.

COMPOSÉS AZOTÉS DANS LES VINS DE GOUTTE, VINS DE PRESSE ET VINS DE LIES

C. POUX

avec la collaboration technique de M. CAILLET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Au cours de deux années différentes a été comparée la composition azotée de vins de goutte, de presse et de lies issus d'une même vendange.

INTRODUCTION

Dans la vinification en rouge, les vins de goutte sont ceux qu'on sépare du marc au moment de la décuvaison, les vins de presse ceux qui sont extraits par pression du marc égoutté. Au moment de leur écoulage, ces deux sortes de vins sont des liquides troubles qui se clarifient au bout de quelques semaines dans les récipients qui les contiennent, en donnant après décantation une partie supérieure claire et dans le fond un dépôt de bourbes appelées « lies ». Le premier soutirage a surtout pour objet de séparer le vin de ces lies et ces dernières, qui sont à ce moment dans un état semi-liquide, sont rassemblées dans des récipients où elles séjournent encore deux ou trois mois durant lesquels s'effectue une deuxième décantation. A la partie supérieure se trouve un liquide surnageant appelé « vin de lies surnageant » sur lequel, le plus souvent, s'effectueront des analyses qui seront la base de transactions commerciales de cette marchandise. A côté de ces vins de lies « surnageants » on trouve aussi des vins de lies pressées ou centrifugées ; dans ce travail nous ne nous occuperons que des premiers, c'est-à-dire des vins de lies surnageants.

Différentes études portant sur des comparaisons de constitution entre les vins de goutte et leur vin de presse correspondant peuvent être trouvées dans les travaux de BOUFFARD (1905), ROOS (1912), HUGUES (1925) et PACOTTET (1926) et, plus récemment, en ce qui concerne les produits azotés, dans ceux de LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (1961). Pour des comparaisons de constitution entre les vins de goutte et les vins de lies correspondants, nous signalerons les travaux de SÉMICHON (1922) et de BOURDET et HÉRARD (1958).

De tous ces travaux on peut retenir les conclusions ci-après.

Vins de presse

Indépendamment des différences dans la teneur alcoolique de ces vins, qui peut varier dans un sens ou dans un autre selon les conditions de vinification, on constate que les vins de presse possèdent une teneur plus élevée que les vins de goutte en ce qui concerne les éléments suivants : extrait sec, tanins, cendres, acide phosphorique, sulfates, chlorures, azote total et ammoniacal (HUGUES, 1925). Pour LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (1961) « les vins de presse sont aussi plus riches en azote que les vins de goutte correspondants (100 à 140 mg/litre), et « cette différence s'explique par un taux plus élevé d'azote précipitable par l'alcool et par davantage de polypeptides ; il y a surtout un enrichissement des fractions azotées à poids moléculaire élevé », mais il y a aussi en ce qui concerne les acides aminés « davantage d'alanine, cystine, leucine, isoleucine, lysine, méthionine, valine, mais surtout d'acide glutamique et de tryptophane ».

Parmi les explications de ces constatations, HUGUES (1925) suggère que : « l'augmentation toujours observée de l'extrait sec est sans doute due au fait que la pression peut extraire des marcs des substances non susceptibles de passer dans le liquide ambiant par le simple phénomène de dialyse ». D'autre part, les travaux de GIRARD et LINDET (1898) et de PEYNAUD et MAURIE (1953) ont montré que les teneurs en azote dans la baie de raisin sont presque aussi élevées dans les pellicules que dans la pulpe, alors que ces pellicules ne représentent que 5 à 10 p. 100 du poids des grains ; comme d'autre part, ces parties solides se rassemblent au cours de la fermentation à la partie supérieure, formant le chapeau de marc qui est plus ou moins lixivié selon les conditions de vinification, il est parfaitement normal qu'il existe une plus grande concentration de matières azotées dans le marc et que son pressurage conduise à l'obtention de liquides à teneur azotée plus élevée.

Vins de lies

On constate, par rapport au vin de goutte correspondant, les caractères suivants : une augmentation de l'extrait sec (50 p. 100), des cendres, de l'acide phosphorique (plus du double) (SÉMICHON, 1922). Cet auteur ne donne pas de chiffres en ce qui concerne la teneur en azote de ces vins, mais s'exprime en ces termes pour fournir une explication aux augmentations constatées : « Les caractères très spéciaux des vins de lies proviennent de la digestion pendant plusieurs semaines de levures vieilles, en voie de décomposition, qui ont été entraînées abondamment avec le vin au moment du décuvage et qui se sont déposées ensuite en constituant la plus grosse partie des lies... le vin s'est enrichi des produits de l'autophagie de la levure, substances azotées que les cellules mortes ont diffusées dans le vin. »

Notons que EFFRONT (1905) signale qu'en présence d'eau additionnée d'alcool (ce qui est le cas des vins de lies), la « dénutrition » de la levure se fait de préférence aux dépens des matières albuminoïdes. Pour BOURDET et HÉRARD (1958), l'augmentation de la teneur en azote des vins, consécutive à une autolyse des levures, résulte d'un accroissement de la concentration en acides aminés libres et en constituants azotés de nature peptidique lorsque le contact du vin et des lies est relativement court (7 jours avec agitation).

Tous les auteurs sont donc d'accord sur cette augmentation globale des substances azotées port des vins de presse ou de lies, par rapaux vins de goutte correspon-

dants. Dans d'autres travaux on a pu aussi étudier l'influence de la macération et du séjour sur lies sur le taux d'acides aminés (LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, 1961 ; C. POUX, C. FLANZY et M. FLANZY, 1964-1965). Dans tous ces travaux, les comparaisons ont porté séparément, à partir d'une matière première différente, soit sur des vins de presse, soit sur des vins de lies, par rapport aux vins de goutte. A notre connaissance, à partir d'une même vendange, on n'a pas encore comparé la composition azotée, à la fois des vins de goutte, de presse et de lies (surnageants) correspondants ; il nous a donc semblé intéressant de tenter cette comparaison, afin de voir si certaines différences essentielles pouvaient se révéler en raison des origines différentes de matières azotées concourant à la composition de ces trois types de vins.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Le matériel est un échantillonnage proportionnel du vin des différentes cuves d'une cave coopérative représentant :

en 1964 un volume de 46 179 hl

(degré alcoolique moyen : 10°2 ; acidité totale : 4, 2 ; acidité volatile : 0,33) ;

et en 1967 un volume de 86 079 hl

(degré alcoolique moyen : 10°8 ; acidité totale : 3, 9 ; acidité volatile : 0,40). Le vin est logé en 200 cuves environ (de volume variant de 200 à 2 000 hl).

En 1964 les vins de presse, répartis en 14 cuves, totalisent 4 270 hl. Les lies représentent 1 020 hl, dont 540 hl de surnageant.

En 1967 les vins de presse sont répartis en 22 cuves pour un volume de 7 000 hl. Les vins de lies résultant de 2 885 hl de lies représentent 795 hl.

Méthodes

Sur les échantillons des vins de goutte, de presse et de lies, les analyses suivantes ont été effectuées :

Azote total : par la méthode de Kjeldahl (JAULMES, 1951).

Azote ammoniacal : par déplacement de l'ammonium par la magnésie calcinée, puis distillation (JAULMES, 1951).

Azote protéique : en 1964 nous avons précipité les protéines par l'acétone glacée (1 vol. de vin/4 vol. d'acétone) (KOCH, 1958 ; P. BOULANGER et G. BISERTE, 1959) ; après centrifugation et lavage du précipité, celui-ci est dissous dans l'eau et ajusté à un volume connu ; sur une partie aliquote, on dose l'azote par la méthode de Kjeldahl (JAULMES, 1951).

En 1967 on a dosé l'azote protéique selon deux modes de précipitation :

— par l'acétone ;

— par l'alcool.

Azote soluble.

On appelle ainsi l'azote contenu dans le surnageant obtenu lors des centrifugations précédentes, débarrassé de l'acétone ou de l'alcool par évaporation sous vide à 45°, repris par l'eau et ajusté à un volume connu ; sur des parties aliquotes de cette solution sont dosés l'azote total et séparément les acides aminés par voie microbiologique (S. ADRIAN, 1955-1960 ; BLOCK R. et WEISS K., 1956 ; S. LAFON LAFOURCADE et E. PEYNAUD, 1959).

Azote aminé total.

Il est constitué par la somme de l'azote de chaque acide aminé dosé séparément par microbiologie, soit sur le vin simplement neutralisé, soit sur la solution renfermant l'azote soluble neutralisé (solution précédente).

II. — RÉSULTATS

Les résultats de nos essais sont rassemblés dans les tableaux 1, 1 *bis*, 2 et 2 *bis*.

TABLEAUX 1 et 1 *bis*

Teneur en azote des vins de la récolte 1964
(Résultats exprimés en mg d'azote par litre de vin)

	Vin de goutte	Vin de presse	Vin de lies
N total.			
Vin initial	223,3	709,2	574,6
Précipitation acétonique :			
Précipité	64,3	269,2	225,3
Liquide	157,8	436,7	352,9
	222,1	705,9	578,2
N ammoniacal	5,3	25,3	41,7
N aminé.			
Vin	161,7	433,5	402,9
Après précipitation acétonique	108,5	282,1	260,1

Teneur en acides aminés des vins de la récolte 1964
(Acides aminés en mg/litre)

	Vin			Solubles dans l'acétone		
	Goutte	Presse	Lies	Goutte	Presse	Lies
Alanine	49,8	182	166,5	49,3	174	157,4
Arginine	53	84	60,6	15,3	47,7	19,5
Acide aspartique	40	184	216,5	28,4	117	93
Cystine	46,6	71	92,7	43	60	79,5
Acide glutamique	96,8	357	351	92,4	323	284,7
Glycocolle	49,5	175	184	32,6	120	115,7
Histidine	25,4	83,7	63,9	2,7	8,1	7,4
Isoleucine	25,8	128	140,5	24,7	118	121
Leucine	31	155	157	32,9	179	160
Lysine	49,9	194	178,5	7,7	29	25,9
Méthionine	38,5	57	72	23,5	49	66
Phénylalanine	38,9	139	134	20,1	67	62,6
Proline	444	719	652	339	431	448
Sérine	90,5	255	229	66,5	180	157,5
Thréonine	35,8	133,5	118	26,5	73	103,5
Tryptophane	6,5	26	20,7	5,7	20	22,1
Tyrosine	46,8	206	115,7	32,8	140	49,2
Valine	36,8	166	160	35,6	157	154

TABLEAU 2

Teneur en azote des vins de la récolte 1967
(Résultats exprimés en mg d'azote par litre de vin)

	Vin de goutte	Vin de presse	Vin de lies
N total.			
Vin initial	195,5	658,8	480
Précipitation acétonique :			
Précipité	52,9	252,7	174,6
Liquide	147,8	418,3	313,7
	200,7	671	488,3
Précipitation alcoolique :			
Précipité	25	101,8	66,2
Liquide	177,7	564,7	419,7
	202,7	666,5	485,9
Fraction du précipité acétonique précipitable par l'alcool :			
Précipité	26,8	81,9	59,2
N ammoniacal	3,9	27,4	21,0
N aminé.			
Vin	125,3	456,2	358,3
Après précipitation acétonique	102,6	288,2	240,6
Après précipitation alcoolique	120,2	411,4	330,4
Après précipitation alcoolique du culot acétonique	20,2	118,7	

III. — DISCUSSION

A. — *Influence de la précipitation par les solvants organiques*

En 1964 nous avons dosé les acides aminés, soit directement sur le vin, soit sur la fraction d'azote soluble, c'est-à-dire avant et après précipitation à l'acétone. La teneur en acides aminés, obtenue après traitement du vin par l'acétone, est généralement plus faible, excepté pour l'alanine, la leucine, le tryptophane et la valine ; par contre, les acides aminés basiques comme l'arginine, la lysine et l'histidine sont presque entièrement précipités.

En 1967 la même expérimentation confirme ces résultats. Cette même année, pour nous rendre compte de l'influence de la qualité du précipitant, nous avons comparativement utilisé la précipitation à l'alcool, en milieu à 80°.

TABLEAU 2 *bis*

Teneur en acides aminés des vins de la récolte 1967

(Acides aminés en mg/litre)

	1			2			3			4		
	Vin			Acides aminés solubles dans l'acétone			Acides aminés solubles dans l'alcool			Acides aminés précipités par l'acétone		
	Goutte	Presse	Lies	Goutte	Presse	Lies	Goutte	Presse	Lies	Goutte	Presse	Lies
Alanine	40,2	146	129	33,5	122	108	37	138	130	4,3	6,8	—
Arginine	15,6	124,6	78,8	6,4	0	8,2	15,5	98,4	65,1	9,5	96,9	56,6
Acide aspartique	33,4	192,2	167,3	29	110,3	99,8	34,6	162,1	138,2	10,1	68,9	44,5
Cystine	30,6	81	68,3	25,4	73,6	52,1	26,1	74,4	54,5	1,6	6,5	—
Acide glutamique	110	444	417	90,5	341	306	108,5	426	407	19	103	80,5
Glycocolle	48	234,1	199	36,7	150,8	142,9	47	236,6	190,8	15,4	67,2	57,3
Histidine	21,4	94,8	62,4	3,2	3,9	5,9	15,6	64	44,1	11,2	54,5	—
Isoleucine	28,8	153	129	30,6	143	119	19	157	123	0	15	—
Leucine	28,6	194,2	131,8	29,3	187,8	130	29,8	190,2	132	0	6,3	5,1
Lysine	35,8	170,1	128,9	6,6	10,3	11,3	27,4	97,8	87,8	17,3	85,2	—
Méthionine	10	77,3	53,8	9,2	44,8	43,1	9,2	51,4	44,8	0	5,4	—
Phénylalanine	20,6	136,7	94,6	21,1	113,9	92,8	22,2	131,2	95,2	0	3,3	—
Proline	396	611	517	391	550	474	395	597	516	13,9	40,4	25,9
Sérine	63,3	270	204	51,5	172,6	122,5	63,4	265	194,7	13,4	88,8	67,4
Thréonine	18,6	106,8	77,5	18,1	71,9	55,9	19,6	92,2	69,4	4,3	23,5	15
Tryptophane	5,2	31,6	21,6	6,2	30,2	19,5	6,3	28,9	20,2	0	0,7	—
Tyrosine	21,8	118,3	73	21,8	107,7	68	21,8	115,8	76,5	0	5,2	3
Valine	40,8	226,6	168,1	30,3	211,3	150	40,9	224,9	167,2	2,2	17,8	—

Après addition d'acétone ou d'alcool au vin, les résultats obtenus sont très différents (tabl. 3). Ils montrent l'importance qu'apporte la nature du précipitant et toute la relativité du terme « protéique » accordé à la forme d'azote ainsi précipitée par les solvants.

TABLEAU 3

Comparaison entre les précipitations par l'acétone et l'alcool (1967)
(Azote en mg/litre)

	Vin de goutte	Vin de presse	Vin de lies
1° *Précipitation unique.*			
N précipité par :			
acétone	52,9	252,7	174,6
alcool	25	101,8	66,2
N aminé soluble (microbiologie) :			
dans l'acétone	102,6	288,2	240,6
dans l'alcool	120,2	411,4	330,4
2° *Double précipitation* (acétonique et alcoolique.) [1]			
a) Azote précipité :			
(protéines insolubles dans l'alcool)	26,8	81,9	59,2
b) Azote soluble dans l'alcool :			
N aminé (microbiologie)	20,2	118,7	# 89,8
N non identifié	5,9	52,1	25,6

(1) Précipité acétonique redissous dans l'eau et reprécipité par l'alcool.

Par double précipitation, obtenue en reprécipitant par l'alcool la solution aqueuse du précipité à l'acétone, on a un nouveau précipité de protéines très voisin en teneur en azote de celui qui résulte de l'addition d'alcool au vin, et une solution qui contient les acides aminés entraînés par la précipitation à l'acétone et des corps non définis solubles seulement dans l'alcool (protéines, polypeptides, etc.).

Ces corps ont été calculés par différence entre l'azote total du précipité à l'acétone et la somme de l'azote du précipité à l'alcool et de l'azote aminé soluble dans l'alcool, dosé par microbiologie (tabl. 3). Le dosage de ces acides aminés en solution alcoolique est donné dans la colonne 4 du tableau 2 *bis*. La figure 2 qui représente l'azote des différents acides aminés groupés par familles donne aussi la quantité de ces acides aminés précipitables par l'acétone. Il est à remarquer que les acides aminés dérivés de l'acide pyruvique précipitent peu.

On voit en outre, en comparant les différents dosages des colonnes 1, 2 et la colonne 4 (tabl. 2 *bis*) que certains acides aminés ont été partiellement précipités par l'acétone, ou entraînés par le précipité, citons particulièrement :

— les acides aminés basiques : arginine, 40 à 100 p. 100 ; lysine et histidine 80 à 90 p. 100 ;

— les acides aminés dicarboxyliques : acide aspartique 10 à 60 p. 100 ; acide glutamique 5 à 30 p. 100 ;

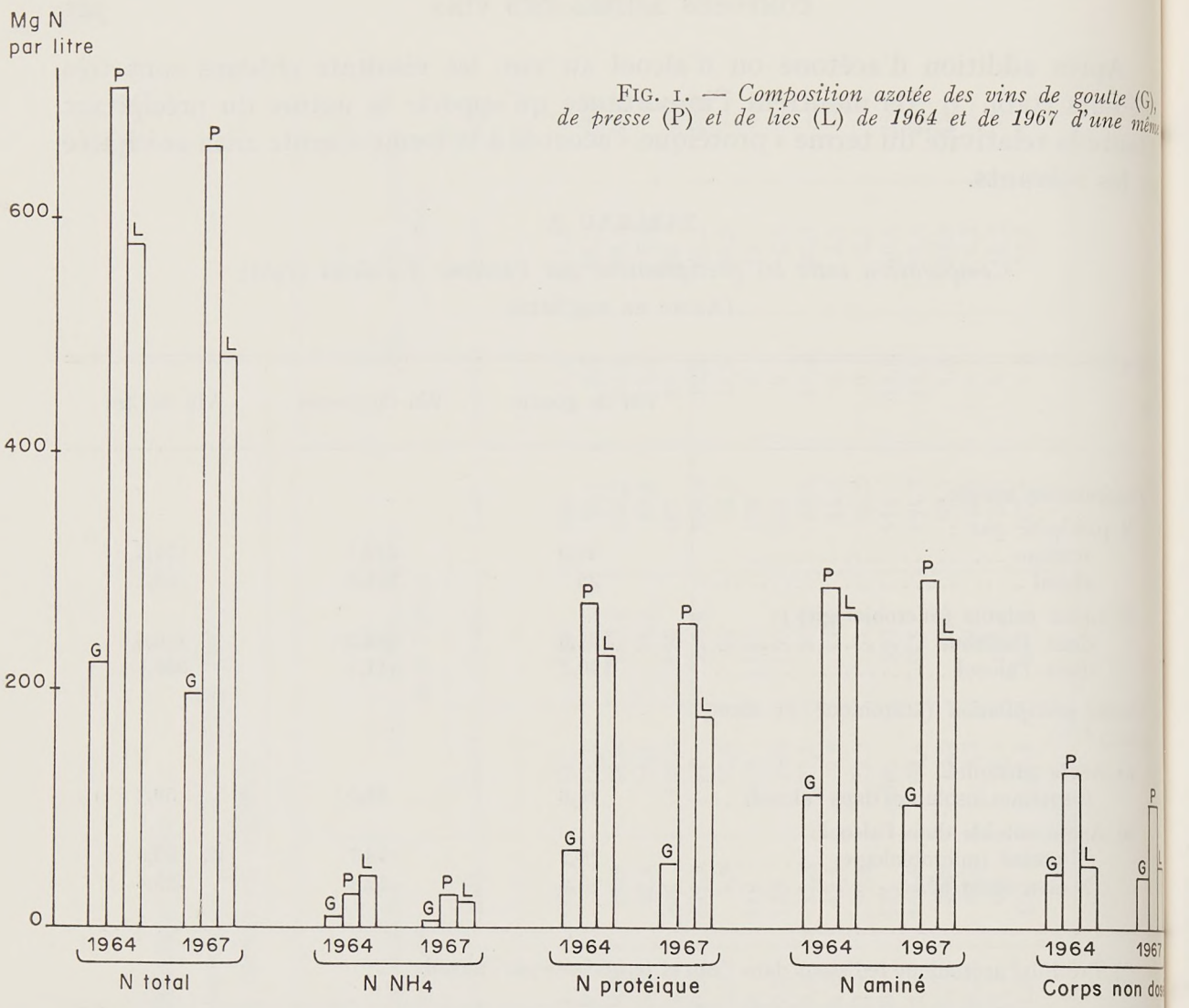


FIG. 1. — *Composition azotée des vins de goutte* (G), *de presse* (P) *et de lies* (L) *de 1964 et de 1967 d'une même*

TABLEAU 4

Composition azotée des vins exprimée en pourcentage d'azote total

	Vin de goutte	Vin de presse	Vin de lies
1964			
N total	100 p. 100	100 p. 100	100 p. 100
N ammoniacal	2,3	3,5	7,2
N protéique (acétone)	28,7	38	39,2
N aminé — Avant l'addition d'acétone	72,4	61,1	70,1
N aminé — Après l'addition d'acétone	48,6	39,7	45,2
N des composés non dosés (acétone)	19,7	18,2	8,8
1967			
N total	100 p. 100	100 p. 100	100 p. 100
N ammoniacal	2	4,1	4,3
N protéique — Précipitation par l'acétone	27	38,3	39,2
N protéique — Précipitation par l'alcool	12,7	15,4	13,7
N aminé — Av. addi. d'acétone ou d'alcool	64	69,2	74,6
N aminé — Après addi. d'acétone	52	43,7	50,1
N aminé — Après addi. d'alcool	61,4	62,4	68,8
N des corps non dosés — En milieu acétonique	20,9	15,5	12,7
N des corps non dosés — En milieu alcoolique	27,4	19,1	14,2

— et d'autres, comme le glycocolle, la sérine, la thréonine : 2 à 45 p. 100 ;
— la valine, l'alanine et la leucine ne sont pratiquement pas précipitées.

B. — *Variation de la composition azotée des vins*

La figure 1 montre l'enrichissement caractéristique en valeur absolue des différentes formes d'azote dans les vins de presse et de lies par rapport au vin de goutte La proportion des différentes formes d'azote analysées, par rapport à l'azote total, est donnée dans le tableau 4.

Nous constatons que *l'azote aminé* représente la fraction la plus importante de ces trois types de vins, avec une valeur intermédiaire dans ces essais entre les chiffres donnés par d'autres auteurs (Lafon-Lafourcade et Peynaud, 1961 ; Bourdet et Hérard, 1958). La répartition entre les différents composés azotés paraît peu variable d'une année à l'autre.

En ce qui concerne *l'ammonium* des vins de lies (7,2 p. 100 en 1964 et 4,3 p. 100 en 1967), il apparaît une différence notable résultant d'une désamination probablement plus poussée en 1964.

Le pressurage, ainsi que la conservation des vins sur lies, ont provoqué une augmentation du pourcentage de la *fraction protéique*, de l'ordre de 10 p. 100, lorsque les dosages ont été effectués après précipitation à l'acétone. En valeur absolue l'augmentation de cette fraction, dite protéique, est de l'ordre de 200 mg par litre avec l'acétone et 75 mg par litre avec l'alcool, pour les vins de presse. Les valeurs de cette fraction sont légèrement plus faibles pour les vins de lies.

Les composés non dosés, représentés par la différence entre l'azote soluble dans 'alcool ou dans l'acétone et la somme de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé sont donnés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Composés azotés non dosés
(mg N par litre)

	Vin de goutte	Vin de presse	Vin de lies
Milieu acétonique			
1964	44	129,3	51,1
1967	41	102,7	52,1
Milieu alcoolique			
1967	53,6	125,9	68,3

Les valeurs obtenues pour ces corps azotés sont différentes selon que l'on considère l'expérimentation basée sur la précipitation à l'acétone ou à l'alcool, car il existe dans les trois types de vins des composés azotés qui peuvent être considérés comme des protéines solubles dans l'alcool et que l'on dose en milieu acétonique.

Ces composés indosés de nature inconnue se retrouvent mentionnés par différents auteurs qui ont été amenés à calculer un bilan des matières azotées (Bourdet et Hérard, 1958 ; Lafon-Lafourcade et Peynaud, 1961 ; Tercelj, 1965). Nous devons reconnaître qu'il existe dans ces bilans, ainsi d'ailleurs que dans ceux qui sont mentionnés dans notre travail, une légère incertitude qui vient d'abord de l'imperfection des méthodes de dosage utilisées. On sait que certains polypeptides interfèrent dans le dosage microbiologique des acides aminés, d'autre part, des acides aminés qui existent comme l'hydroxyproline, l'acide α-amino-butyrique, par exemple, ne sont pas dosés avec les méthodes employées. Il est raisonnable de penser que l'on peut ranger aussi dans ces composés indosés un certain nombre de polypeptides, des hexosamines, des composés nucléiques et certaines protéines solubles.

On peut toutefois remarquer (tabl. 4), que la proportion de ces composés indosés va en diminuant lorsque l'on passe des vins de goutte aux vins de presse et de lies.

C. — *Influence de la nature des vins*

Parmi les trois types de vins analysés, les vins de goutte offrent la plus faible teneur en composés azotés ; les vins de presse et de lies présentent, au contraire, une élévation remarquable de cette teneur. Ils renferment deux à trois fois plus d'azote total, quatre à sept fois plus d'azote ammoniacal, trois à quatre fois plus d'azote protéique et deux à trois fois plus d'azote aminé (fig. 1).

Le tableau 6 montre l'importance de cette augmentation à l'aide des valeurs calculées du rapport : $\frac{\text{Azote des vins de presse ou de lies}}{\text{Azote des vins de goutte}}$ pour différentes formes d'azote.

Dans tous nos résultats on peut remarquer que l'accroissement des composés azotés des vins de lies est légèrement plus faible que celui des vins de presse, alors que l'on aurait pu logiquement imaginer le contraire.

On peut penser que l'origine de l'enrichissement azoté des vins de presse et de lies est différente.

En effet, les vins de presse doivent une partie de cet enrichissement au pressurage qui extrait l'azote accumulé dans les pellicules et la pulpe du raisin (Girard et Lindet, 1898 ; Peynaud et Maurie, 1953 ; Gendron, 1967), en plus de celui qui provient des levures ou de leur métabolisme et qui se sont concentrées dans le chapeau de marc.

Les vins de lies sont les liquides surnageants des lies des vins de goutte et de presse rassemblés dans des cuves au fur et à mesure des opérations de soutirage. Leur accroissement en composés azotés, toujours légèrement plus faible que celui des vins de presse, provient, d'une part, de la fraction des vins de presse qui les compose et d'autre part, de l'exsorption et d'un début d'autolyse de l'énorme masse de levures rassemblées dans les lies.

Comme dans la cave étudiée les vins de presse représentent 9 p. 100 des vins de goutte en 1964 et 8 p. 100 en 1967, on a comparé la composition théorique qui devrait en résulter avec la composition réelle trouvée (tabl. 7).

Ces vins se sont donc enrichis au contact des lies de 10 p. 100 environ d'azote protéique. En relation avec ce qui a été indiqué précédemment pour les vins de presse, il est curieux de constater que cette augmentation est du même ordre de grandeur.

TABLEAU 6

TABLEAU 6

Rapport : $\frac{\textit{Azote des vins de presse ou de lies}}{\textit{Azote du vin de goutte}}$

	Vin de presse						Vin de lies					
	1964			1967			1964			1967		
N total	3,1			3,3			2,5			2,4		
N ammoniacal	4,7			7,0			7,8			7,3		
N protéique (acétone)	4,1			4,7			3,5			3,3		
N protéique (alcool)	—			4			—			2,6		
N aminé total :												
— du vin	2,6			3,6			2,4			2,8		
— de la fraction soluble dans l'acétone	2,6			2,8			2,3			2,3		
— de la fraction soluble dans l'alcool	—			3,4			—			2,7		
N non dosé :												
— dans l'acétone	2,9			2,5			1,1			1,2		
— dans l'alcool	—			2,3			—			1,2		
N aminé par familles :	N° 1 (1)	N° 2	N° 3	N° 1	N° 2	N° 3	N° 1	N° 2	N° 3	N° 1	N° 2	N° 3
Famille de l'acide glutamique : Acide glutamique, arginine, lysine, proline	2,0	1,8		2,6	1,7	2,3	1,8	1,6		2,1	1,5	2
Famille de l'acide aspartique : Acide aspartique, thréonine, méthionine, isoleucine	3,6	3,4		5,8	4,8	5,6	3,8	3,7		4,6	4,1	4,5
Famille dérivée de l'acide pyruvique : Valine, alanine, leucine	4,1	4,2		4,9	4,9	4,9	4	3,8		3,8	3,7	3,9
Famille dérivée des trioses : Sérine, glycocolle, cystine	2,8	2,6		4,2	3,5	4,3	2,8	2,5		3,4	2,9	3,3
Famille aromatique : Histidine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane	3,6	3,7		5,1	4,4	4,7	2,7	2,4		3,3	3,3	3,3

(1) N° 1 = Vin ; N° 2 = Fraction soluble dans l'acétone ; N° 3 = Fraction soluble dans l'alcool.

Tout se passerait comme si une saturation en éléments protéiques ne pouvait être dépassée dans la phase liquide hydroalcoolique. En effet, la phase solide des lies renferme encore une importante réserve d'azote. De plus, on peut observer une diminution de la fraction aminée et une augmentation du pourcentage de l'ammonium, ce fait suggère une désamination des acides aminés avec libération d'ammonium.

TABLEAU 7

Composés azotés des vins de lies

Pourcentages par rapport à N total

Vins de lies	1964			1967		
	Théorique	Réel	Différence	Théorique	Réel	Différence
N ammoniacal	2,4	7,2	+ 4,8	2,1	4,3	+ 2,2
N protéique (acétone)	29,5	39,2	+ 9,7	27,9	39,2	+ 11,3
N aminé (acétone)	47,7	45,2	— 2,5	51,3	50,1	— 1,2

On pouvait dès lors se demander, en raison des origines diverses de ces types de vins, si l'on pouvait déceler des différences soit dans la nature, soit dans les proportions des acides aminés qu'ils contiennent, afin de permettre de les caractériser.

En comparant les taux d'accroissement de l'azote des acides aminés groupés par familles selon A. Moat et F. Ahmad (1965), on peut voir (tabl. 6) que lorsque l'on passe des vins de presse aux vins de lies, ce taux généralement décroît faiblement (1967) ou tout au plus reste constant (1964), pour les quatre familles : glutamique, aspartique, pyruvique et triose.

L'abaissement de ce taux est au contraire particulièrement marqué pour les familles des acides aminés aromatiques laissant supposer que ces acides sont très bien extraits au cours du pressurage parce qu'ils existent encore en plus grande quantité dans le chapeau de marc et certainement dans les pellicules dont ils proviennent.

En dehors de cette observation il est difficile de déceler d'autres caractères différentiels parmi les composés azotés des vins de presse et de lies étudiés.

D. — *Influence de l'année*

En ce qui concerne la synthèse des protéines, Koch (1963), étudiant certains cépages rhénans, a remarqué qu'ils présentent, les années ayant un ensoleillement au-dessus de la moyenne, une teneur en protéines solubles beaucoup plus élevée.

Dans un travail précédent (C. Flanzy et C. Poux, 1965), il a été suggéré que la composition en acides aminés des moûts et, partant, des vins était influencée par les conditions climatiques de l'année.

Les vins de 1967 sont plus pauvres en azote que ceux de 1964 (tabl. 1 et 2 et fig. 1), on pourrait donc penser que la teneur en azote total serait une caractéristique de l'année puisque cette diminution est commune aux trois types de vins. Cependant,

si l'on examine plus en détail les différentes formes d'azote on peut observer que les variations ne vont pas toujours dans le même sens que celui de l'azote total. En 1967, alors que l'azote total est plus faible qu'en 1964, l'azote aminé des vins de presse est, par contre, plus élevé. Ceci nous amène à comparer l'influence de l'année séparément sur les trois types de vins étudiés.

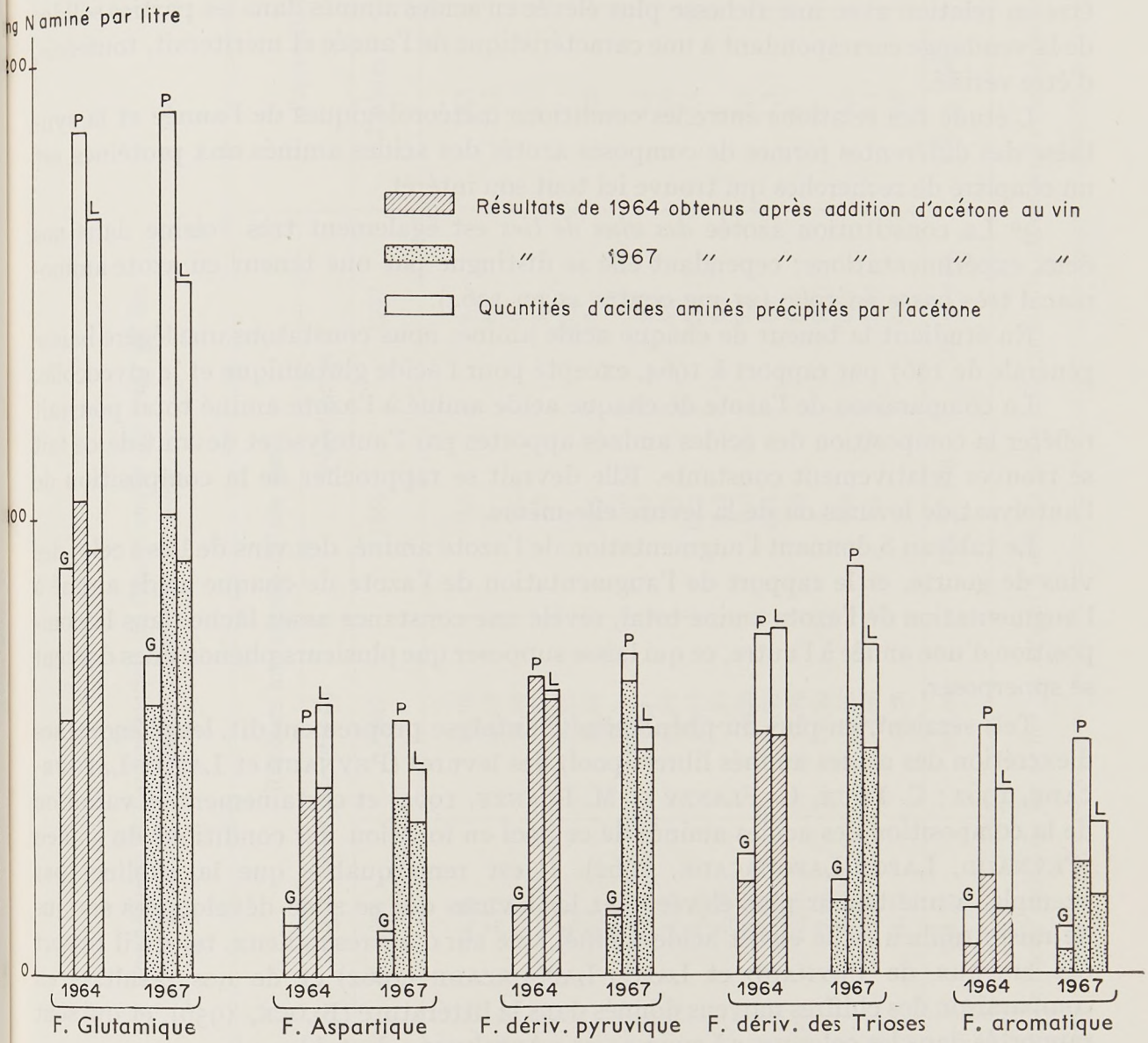


FIG. 2. — *Composition en acides aminés des vins de goutte* (G), *de presse* (P) *et de lies* (L) *exprimée par familles d'acides aminés en mg d'N par litre*

1° *Les vins de goutte* ne présentent que très peu d'écart entre ces deux années. Les pourcentages de 1967 par rapport à 1964 sont les suivants : azote total : 87,5 p. 100 azote ammoniacal : 73,5 p. 100 ; azote protéique (acétone) : 82 p. 100 ; azote aminé (acétone) : 94,0 p. 100.

Pris individuellement, presque tous les acides aminés de 1967 présentent une diminution, parfois très nette ; c'est le cas, par exemple, de l'arginine et de la méthionine (tabl. 1 *bis* et 2 *bis*).

2° *Les vins de presse,* dans leur ensemble, présentent des variations inférieures à 10 p. 100 de leurs composés azotés, leurs pourcentages de 1967 par rapport à 1964

sont les suivants : azote total : 92 p. 100 ; azote ammoniacal : 108 p. 100 ; azote protéique (acétone) : 93 p. 100 ; azote aminé (acétone) : 102 p. 100.

Pris individuellement, les acides aminés de 1967 présentent le plus souvent (sauf l'alanine, la proline et la tyrosine) une concentration plus élevée que celle de 1964 déterminant cet accroissement global de la teneur de la fraction aminée. Ceci pourrait être en relation avec une richesse plus élevée en acides aminés dans les parties solides de la vendange correspondant à une caractéristique de l'année et mériterait, toutefois, d'être vérifié.

L'étude des relations entre les conditions météorologiques de l'année et la synthèse des différentes formes de composés azotés des acides aminés aux protéines est un chapitre de recherches qui trouve ici tout son intérêt.

3° La constitution azotée *des vins de lies* est également très voisine dans nos deux expérimentations ; cependant elle se distingue par une teneur en azote ammoniacal très basse en 1967 (21 mg contre 41 en 1964).

En étudiant la teneur de chaque acide aminé, nous constatons une légère baisse générale de 1967 par rapport à 1964, excepté pour l'acide glutamique et le glycocolle.

La comparaison de l'azote de chaque acide aminé à l'azote aminé total pourrait refléter la composition des acides aminés apportés par l'autolyse et devrait de ce fait se trouver relativement constante. Elle devrait se rapprocher de la composition de l'autolysat de levures ou de la levure elle-même.

Le tableau 8 donnant l'augmentation de l'azote aminé, des vins de lies à celui des vins de goutte, et le rapport de l'augmentation de l'azote de chaque acide aminé à l'augmentation de l'azote aminé total, révèle une constance assez lâche dans la composition d'une année à l'autre, ce qui laisse supposer que plusieurs phénomènes doivent se superposer.

Tels seraient, en plus du phénomène d'autolyse proprement dit, les phénomènes d'excrétion des acides aminés libres (pool) des levures (Peynaud et Lafon-Lafourcade, 1962 ; C. Poux, C. Flanzy et M. Flanzy, 1964) et certainement la variation de la composition des acides aminés de ce pool en fonction des conditions du milieu (Peynaud, Lafon-Lafourcade, 1962). Il est remarquable que la proline, par exemple, a une teneur plus élevée chez les levures qui se sont développées sur jus de raisin (milieu riche en cet acide aminé), que sur d'autres milieux, tel qu'il ressort des travaux de Peynaud et Lafon-Lafourcade (1962) et de nos résultats en comparaison des chiffres moyens donnés dans la littérature (Block, 1956), et qui sont rapportés dans les colonnes « Levures » et « Autolysat » du tableau 8.

Dans nos essais, la part des acides aminés du pool et de ceux provenant de l'autolyse n'a pu être distinguée, c'est peut-être la raison pour laquelle on enregistre ces variations de composition. Quoi qu'il en soit, sur dix-huit acides aminés dosés, onze se révèlent avoir un taux très voisin ou identique à celui d'un autolysat de levures ou de la levure elle-même (tabl. 8).

On pourrait donc penser qu'il existe un phénomène d'autolyse, c'est-à-dire d'hydrolyse des protéines de cellules de levures. Cependant comme le font remarquer Dupuy, Morfaux et Usciati (1967) l'exsorption normale des acides aminés du pool de la levure peut représenter 15 à 20 p. 100 de l'azote total. Or, dans les conditions de notre expérimentation, on peut calculer, en admettant une production moyenne de 1 gramme de levure par litre de vin élaboré et une teneur en azote de 6 p. 100 pour

TABLEAU 8

Composition de l'augmentation de l'azote aminé des vins de lies par rapport aux vins de goutte

	Résultats analytiques de nos essais				d'après Block (1956)	
	mg N aminé par litre (1)		Pourcentage			
	1964	1967	1964	1967	Levures	Autolysat
Alanine	18,35	13,96	7,6	6	10,8	11,5
Arginine	2,44	20,29	1	8,7	11,4	11
Acide aspartique	18,57	14,08	7,6	6	7	11,5
Cystine	5,37	4,4	2,2	1,8	1	1,3
Acide glutamique	24,2	29,22	10	12,5	9	8,1
Glycocolle	25,1	28,18	10,4	12	6,2	7,4
Histidine	10,43	11,1	4,3	4,7	5	4,5
Isoleucine	12,04	10,7	4,9	4,5	4,5	4,1
Leucine	13,45	11,02	5,5	4,7	5,6	5,9
Lysine	24,64	17,84	10,2	7,6	10,4	11,3
Méthionine	3,15	4,12	1,3	1,7	1	0,97
Phénylalanine	8,07	6,28	3,3	2,6	2,7	2,3
Proline	25,31	14,72	10,4	6,3	4,1	3,3
Sérine	18,46	18,76	7,6	8	6	5,6
Thréonine	9,66	6,93	4	2,97	5	2,7
Tryptophane	1,95	2,25	0,8	0,96	1,5	1,4
Tyrosine	5,33	3,96	2,2	1,69	2,1	1,4
Valine	14,73	15,25	6	6,5	5,8	4,9
N aminé total	241,25	233,04	100 p. 100	100 p. 100	100 p. 100	100 p. 100

(1) Augmentation de la teneur en azote de l'acide aminé du vin de lies par rapport à celle du même acide aminé du vin de goutte correspondant.

la levure, que l'enrichissement en azote des vins de lies est respectivement de 12,5 p. 100 en 1964 et 14 p. 100 en 1967. Ces pourcentages n'excèdent pas ceux qui pourraient provenir du pool de la levure dus au phénomène d'exsorption (MORFAUX et DUPUY, 1966). Ceci montrerait que la part de l'autolyse, si elle existe dans l'enrichissement des vins de lies, n'est certainement pas prépondérante.

CONCLUSIONS

Les vins de presse et de lies diffèrent profondément par leur teneur élevée en différentes formes d'azote, des vins de goutte correspondants ; ils possèdent deux à trois fois plus d'azote total et d'azote aminé, lequel représente la part la plus importante de l'azote. L'azote protéique (précipité) voit aussi son pourcentage augmenter, plus élevé d'ailleurs dans les vins de presse que dans les vins de lies. Enfin, l'azote des corps non dosés croît de une à trois fois environ avec un pourcentage plus élevé dans les vins de presse. Toutefois, les différences entre les vins de presse et de lies qui existent quant à leur origine ne se répercutent que très peu sur les proportions des différentes formes d'azote et, en particulier, sur les acides aminés. Seule la proportion des acides aminés aromatiques semble plus élevée dans les vins de presse que chez les vins de lies, au moins pour les vins étudiés, sans que l'on puisse *a priori* formuler une généralisation.

Dans la pratique, les mélanges de ces différentes sortes de vins, lorsqu'ils s'effectuent, ne se font que dans des proportions ordinairement très faibles avec les vins de goutte ; il devient, par conséquent, très difficile, de déceler leur présence dans un mélange par l'analyse des acides aminés en particulier. Il faudra donc s'orienter sur des analyses plus spécifiques, soit des différentes formes protéiques, soit des composés azotés indosés.

Dans un domaine différent, ces essais, en ce qui concerne les vins rouges de presse, confirment que leur composition azotée, tant en acides aminés qu'en composés encore indosés, est un facteur souvent favorable à certaines fermentations secondaires, soit utiles et désirées, comme une fermentation malolactique, soit nuisibles dans le cas de maladies microbiennes, comme la tourne.

Reçu pour publication en octobre 1968.

SUMMARY

NITROGEN CONTENT OF FIRST PRESSINGS OF WINES, PRESS WINES AND LEES WINES

A comparison has been made as to the nitrogen content of first pressings of wines, and lees wines, produced from the same vineyard in two different years.

The measured forms of nitrogen were : total nitrogen, ammoniacal nitrogen, protein nitrogen, determined by precipitation with acetone and alcohol, and the amino acids determined by microbiological methods.

The results reveal a clear increase in the different forms of nitrogen in the press wines and lees wines by comparison with the corresponding first pressings.

This nitrogen enrichment of the press and lees wines has been discussed in relation to the different origines of these wines ; in any case the differences in composition, which it has been possible to detect between the press and lees wines, do not permit any very clear differentiation to be made between these two types of wine, at least as far as the measured forms of nitrogen were concerned. It appears, therefore, that any future differentiation will have to be based either on analyses of other forms of protein nitrogen or on the investigation of nitrogen compounds not so far measured.

RESUMEN

COMPOSITIÓN NITROGENADA EN LOS VINOS DE YEMA, VINOS DE PRENSA Y VINOS DE HECES

Se ha procedido a la comparación de la composición nitrogenada de los vinos de yema y de heces elaborados a partir de una misma vendimia, durante dos años distintos.

Las formas de nitrógeno dosificadas han sido : el nitrógeno total, amoniacal, proteico, por precipitatión de la acetona y del alcohol, y los ácidos aminados por vía microbiológica.

Los resultados obtenidos demuestran un resuelto aumento de las distintas formas de nitrógeno en los vinos de prensa y de heces en relación con los vinos de yema correspondientes.

Este enriquecimiento nitrogenado en los vinos de prensa y de heces ha sido discutido en función de sus orígenes. No obstante, las diferencias de composición que han podido observarse entre ambos vinos no permiten caracterizar de forma muy neta los dos tipos de vinos, por lo menos con las formas de nitrógeno que han podido ser dosificadas. Por consiguiente, parece que sea preciso orientarse, para diferenciarlas, ya sera hacia los análisis de las distintas formas de nitrógeno proteico o bien hacia la investigación de compuestos nitrogenados indosificados.

RASSIUNTO

COMPOSIZIONE AZOTATA NEGLI SPREMONI, VINI DI PRESSA, E VINI DI FECCE

Si è confrontata la composizione azotata dei vini spremoni (mosti colati) e di fecce elaborate a partire da una stessa vendemmia, durante due anni differenti.

Le forme d'azoto dosate sono state : l'azoto totale, ammoniacale, proteico per precipitazione all'acetone ed all'alcool e gli acidi aminici per via microbiologica.

I risultati fanno apparire un netto aumento delle differenti forme di azoto nei vini di pressa e di fecce in confronto dei vini spremoni e mosti colanti corrispondenti.

Questo arrichimento azotata nei vini di pressa e di fecce è stato discusso in funzione delle loro origini differenti ; tuttavia le differenze di composizione che si sono potute notare fra i vini di pressa e di fecce non permettono una caratterizzazione molto netta tra questi due tipi di vini, almeno con le forme d'azoto che hanno potuto essere dosate. Sembra dunque che bisogna orientarsi per differenziarli, sia verso le analisi delle differenti forme d'azoto proteico, sia verso le ricerche del composti azotati non dosati.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADRIAN S., 1955. Nouvelle technique pour le dosage simultané des acides aminés indispensables et conditions de leur extraction en présence de glucides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 107-121.

ADRIAN S., 1960. Le dosage des acides aminés par voie microbiologique : aminoacides, peptides, protéines, M. Vigneron. *Tech. Trav. expér.*, **4**, 121-140.

BLOCK R., WEISS I., 1956. *Aminoacid Hand Book*. 326-327. Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois U. S. A.

BOUFFARD, 1905. *Ann. Éc. nation. sup. agron.*, Montpellier.

BOULANGER P., BISERTE G., 1959. *Isolement et préparation des protéines. Traité de Biochimie Générale*, T.I, 2e fascicule, p. 715. Masson éditeur.

BOURDET A., HÉRARD J., 1958. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 177-202.

DUPUY P., MORFAUX J. N., USCIATI M., 1967. Métabolisme azoté des levures en œnologie. *IIe Symp. internation. Œnol. Fermentation et Vinification.* Bordeaux-Cognac, 107-123, I. N. R. A., Paris.

EFFRONT J., 1905. Sur l'autophagie de la levure. *Monit. Scient.*, Livraison 763, juillet, 485-491.

FLANZY C., POUX C., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins : protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 283-300.

FLANZY C., POUX C., 1965. Les levures alcooliques dans les vins : protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **14** (1), 35-48.

FLANZY C. POUX C., 1965. Note sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année (maturation et fermentation). *Ann. Technol. agric.*, **14**, 87-91.

GENDRON C., 1967. Thèse, Nantes.

GIRARD, LINDET L., 1898. Recherches sur le développement progressif de la grappe de raisin. *Rev. Vitic.*, **9**, 737-744.

HUGUES E., 1925. Analyses comparatives des vins rouges de goutte et de presse de différentes caves. *Ann. Falsif.. Fraudes.*, **193**, 347-353.

JAULMES P., 1951. *Analyse des vins.* Librairie Poulain, Montpellier.

KOCH J., 1958. *Die Eiweissstoffe in Fruchtsäften ihre Abhängigkeit von der Reife und den Kellertechnischen Massnahmen.* Symposium de Bristol, Concentrés de Jus de fruits.

KOCH J., 1963. Protéines des vins blancs. Traitements des précipitations protéiques par chauffage et à l'aide de la bentonite. Ier Symp. internation. Œnol., Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **12** (no hors-série), 297-313.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1959. Dosage microbiologique des acides aminés des moûts de raisin et des vins. *Vitis*, mars, 45-56.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 143-160.

MOAT A., AHMAT F., 1965. Biosynthesis and interrelationships of amino acids in Yeast. *Wallerstein. Lab. Communic.*, **28**, no 96.

MORFAUX J. N., DUPUY P., 1966. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 1224.

PACOTTET 1926. *Vinification, Encyclopédie agricole.* J.-B. Baillière et Fils, Éd. Paris.

PEYNAUD E, MAURIE A., 1953. Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 15-25.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., 1962. Sur la nutrition azotée des levures de vin. *Rev. Ferm. Industr. alim.*, **17**, 11-21.

POUX C., FLANZY C., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins: protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 5-18.

ROOS 1912. Vin de goutte et vin de marc. *Ann. Falsif. Fraudes*, nov.

SÉMICHON L., 1922. Sur la composition des lies de vin et des vins de lies. *Rev. Vitic.*, **156**, *C. R. Acad. Sci.* **174**, 1179-1182.

TERCELJ D., 1965. Étude des composés azotés du vin. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 307-319.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 333-340.

SUR L'OXYDATION DU MOÛT DE RAISIN

III. — ACTIVITÉ DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE ET DE LA PEROXYDASE AU COURS DE LA MATURATION DU RAISIN DES CÉPAGES « MUSCAT ROUGE », « DIMIAT », « RIESLING » ET « ALIGOTÉ » (1)

T. IVANOV, Anna IVANOVA

Institut technologique supérieur des Industries alimentaires
Institut supérieur d'agronomie, Plovdiv (Bulgarie)

SOMMAIRE

Le raisin renferme un grand nombre d'enzymes oxydatifs, dont la nature n'est toujours pas suffisamment étudiée.

L'objectif du présent mémoire est l'étude comparée de l'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase dans les grains entiers (sans pépins), dans les pellicules, dans la pulpe + jus et dans le jus de raisin des cépages *Muscat rouge*, *Dimiat*, *Riesling* et *Aligoté*. On envisage l'activité de ces deux oxydases au cours de la maturation de ces cépages, largement employés pour la préparation de vins mousseux et de vins blancs de table.

INTRODUCTION

Ayant trait à la qualité des vins, le problème des enzymes se pose de plus en plus impérieusement, témoin les journées scientifiques consacrées aux activités enzymatiques et à la technologie des denrées alimentaires qui ont eu lieu à Paris le 23-26 janvier 1967. Nous nous faisons un devoir de signaler que M. C. POUX (1967) y a présenté un rapport circonstancié sur le problème des enzymes oxydatifs du raisin, insistant sur la nécessité d'en approfondir l'étude. Nous ralliant à son appel, nous exposons dans le présent mémoire les résultats de nos recherches comparées sur

(1) Les première et deuxième parties de cet article ont paru dans les numéros 1 et 2 des *Ann. Technol. agric.*, 1967, **16**.

l'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase au cours de la maturation du raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté* largement employés à la préparation de vins mousseux et de vins blancs de table.

Le présent mémoire fait suite aux recherches sur les enzymes oxydatifs du raisin, commencées en 1964 et dont une partie est publiée. IVANOV (1966 *a*, 1967 *a*) y traite de l'activité de la polyphénoloxydase au cours de la maturation et de la maturité physiologique du raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté*. Dans deux autres publications (1966 *b*, 1967 *b*) IVANOV traite des effets de l'anhydride sulfureux et de la bentonite en tant qu'inactivateurs de la polyphénoloxydase du moût de raisin.

Les publications précitées comportant des références bibliographiques relativement détaillées, nous nous permettons de les omettre dans la présente, afin de ne pas nous répéter.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Nous avons déterminé l'activité de la polyphénoloxydase par la méthode à la purpurogalline de WILLSTÄTTER et STOLL (1918) pour la détermination de la peroxydase, modifiée plus tard par KEILLIN et MANN (1938), en vue de la détermination de la polyphénoloxydase aussi. Cette modification fut décrite plus tard par BOKOUTCHAVA (1948), BÖTTCHER (1961), DEIBNER et RIFAI (1963) et d'autres, qui y portèrent certains changements. Nous avons utilisé cette méthode dans nos précédentes recherches aussi.

Nous avons donc déterminé l'activité de la peroxydase par la méthode citée, additionnant le mélange réactionnel de 2,50 ml 0,5 p. 100 de solution de H_2O_2 et retranchant l'activité de la polyphénoloxydase de l'activité totale des deux enzymes.

Nous avons déterminé l'activité des deux enzymes dans des grains entiers (sans pépins), dans des pellicules, dans de la pulpe + jus et dans du jus. Pour ce faire, nous avons pesé sur une balance d'analyse 4 — 5 g de grains entiers, 0,6 — 0,8 g de pellicules, 5 — 6,5 g de pulpe + jus et 10 ml de jus, veillant à ce que le mélange réactionnel ne contienne plus de 8-10 mg de purpurogalline, car une quantité dépassant cette limite nuirait à la précision de la méthode. Le matériel ainsi pesé est pilé avec un peu de quartz arénacé dans un mortier en porcelaine. L'essai se déroule ensuite dans les conditions suivantes : pH 5,9, substratum 1,25 g de pyrogallol, volume du mélange réactionnel 100 ml, durée de la réaction 5 minutes. L'élution de la purpurogalline s'effectue moyennant un volume déterminé d'éther et la photométrie avec l'appareil de Pulfrich (filtre de 42 et cuvette de 5 mm). Par la méthode de Bertrand nous avons déterminé la teneur en sucres du jus de raisin et au potentiomètre, l'acidité de titration et le pH. Nous prélevions des prises d'essais de raisin tous les sept jours.

Les cépages sur lesquels ont porté nos essais ont été cultivés dans des conditions identiques de sol, de climat et de méthodes culturales. Ce fait a permis d'établir la corrélation existant entre le cépage et la dynamique de l'activité de la polyphénoloxydase et la peroxydase au cours de la maturation du raisin.

RÉSULTATS

Les résultats de nos essais figurent dans le tableau 1. Les données sur l'activité de la polyphénoloxydase dans le raisin coïncident en général avec celles obtenues dans nos recherches effectuées en 1965 (IVANOV, 1966 *a*).

La présente étude comparée sur la polyphénoloxydase et la peroxydase a permis d'établir que l'activité des deux enzymes est la plus intense dans les pellicules du

TABLEAU I

Activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase

Date de l'analyse (1967)	Polyphénoloxydase				Peroxydase				Sucres g/l	Acidité de titration g/l	pH
	En mg de purpurogalline par gramme d'extrait sec abs.										
	Grains entiers	Pellicules	Pulpe + jus	Jus	Grains entiers	Pellicules	Pulpe + jus	Jus			
Muscat rouge											
21 août	24,74	79,45	11,69	6,20	29,38	151,75	5,01	3,00	94,00	11,62	2,99
28 août	15,39	62,07	8,05	3,70	13,16	41,40	1,06	2,44	122,70	10,12	3,07
4 septembre	14,70	41,72	6,54	3,62	11,82	96,44	2,94	1,85	154,85	6,97	3,13
11 septembre	13,27	37,16	6,43	4,33	16,59	77,71	2,91	2,44	150,00	6,75	3,02
18 septembre	12,31	44,40	4,14	3,63	14,09	65,54	2,65	1,63	156,30	6,60	3,20
25 septembre	12,67	26,39	5,52	3,89	11,83	77,97	3,16	1,49	175,70	5,77	3,19
2 octobre	10,72	45,31	5,88	4,63	17,37	62,92	3,26	2,35	179,10	5,77	3,19
11 octobre	11,64	27,34	4,57	3,45	10,32	55,87	1,81	1,58	198,10	4,95	3,37
Dimiat											
21 août	20,52	49,39	9,29	3,55	11,24	46,60	5,29	1,88	117,00	12,37	2,99
28 août	16,97	52,21	9,89	4,42	8,24	46,07	3,16	0,22	115,80	12,60	2,95
4 septembre	15,07	41,34	9,56	2,92	5,26	40,40	0,72	0,73	131,15	11,32	3,09
11 septembre	9,24	38,54	6,83	2,32	7,65	33,98	0,99	0,58	175,70	7,72	3,26
18 septembre	9,71	27,48	5,04	3,58	5,84	24,72	2,10	—	175,70	7,12	3,33
2 octobre	11,67	35,14	4,00	3,24	4,45	30,73	2,13	0,16	179,10	6,45	3,29
11 octobre	7,40	28,06	2,95	1,88	6,70	32,82	2,49	—	198,10	6,15	3,38

TABLEAU I (*suite*)

Activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase

Date de l'analyse (1967)	Polyphénoloxydase				Peroxydase				Sucres g/l	Acidité de titration g/l	pH
	En mg de purpurogalline par gramme d'extrait sec abs.										
	Grains entiers	Pellicules	Pulpe + jus	Jus	Grains entiers	Pellicules	Pulpe + jus	Jus			
Riesling											
21 août	22,40	61,85	11,90	10,79	64,65	92,79			73,40	22,50	2,99
28 août	17,26	52,32	11,82	8,15	10,89	38,72			105,75	17,20	3,13
4 août	19,65	52,07	9,45	5,55	14,50	63,57	1,60	2,39	189,30	8,70	3,09
11 septembre	16,66	48,23	9,26	3,30	13,05	52,24	4,06	1,83	208,20	7,50	3,29
18 septembre	14,81	33,40	3,40	3,57	7,21	22,98	3,35	1,51	228,20	6,97	3,31
25 septembre	16,11	41,45	5,41	4,01	11,30	48,70	3,22	1,17	231,60	7,20	3,35
2 octobre	11,53	36,72	6,00	3,45	9,87	40,65	2,87	1,20	255,60	6,37	3,35
11 octobre	12,44	31,85	4,12	3,73	11,27	19,12	2,73	1,89	269,00	6,60	3,38
Aligoté											
21 août	20,10	56,03	10,82	5,08	7,35	59,03	2,11	0,79	114,10	19,87	2,82
28 août	20,71	35,40	11,11	2,91	11,65	65,62	2,71	1,55	131,15	15,60	2,95
4 septembre	17,12	37,02	12,26	2,03	14,04	49,92	2,84	1,58	180,65	11,47	3,14
11 septembre	14,75	28,38	10,80	2,79	12,65	51,33	1,07	1,81	204,80	9,52	3,36
18 septembre	16,11	42,43	9,51	2,21	9,59	27,19	1,85	2,21	211,50	8,40	3,35
25 septembre	11,59	43,71	8,51	2,02	14,84	60,95	1,77	1,15	191,80	7,80	3,36
2 octobre	15,10	32,33	9,01	2,24	15,77	63,98	4,67	1,51	198,10	7,50	3,26
11 octobre	12,39	29,30	6,80	2,86	7,60	45,13	3,55	0,69	288,00	7,20	3,38

raisin, puis dans la pulpe + jus et la moins intense dans le jus. Dans les grains (sans pépins) l'activité des enzymes est moyenne. Cet état des choses ne subit pas de modifications depuis le moment de la véraison en masse du raisin (21 août) jusqu'à la fin de nos essais (11 octobre).

Nous avons constaté que l'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase dans les parties envisagées du raisin est la plus intense au moment de la véraison en masse et qu'elle baisse au fur et à mesure que le raisin mûrit. Cette baisse d'intensité de l'activité est plus sensible dans les pellicules du raisin et relativement moins sensible dans la pulpe + jus et dans le jus. Le 21 août, au moment où le raisin des cépages expérimentés était encore vert, l'activité de la peroxydase dans les pellicules était plus élevée que celle de la polyphénoloxydase, exception faite pour le cépage *Dimiat*. A cette date, pour le cépage *Muscat rouge* l'activité de la peroxydase et de la polyphénoloxydase dans les pellicules du raisin était respectivement de 151,75 et 79,45 pour le cépage *Riesling*, 92,78 et 61,85 pour le cépage *Aligoté*, 59,03 et 56,03 pour le cépage *Dimia*, 46,60 et 49,34 mg de purpurogalline pour un gramme d'extrait sec absolu.

Pendant toute la durée des essais, la peroxydase dans les pellicules du raisin du cépage *Muscat rouge* a manifesté une activité deux fois plus élevée que celle de la polyphénoloxydase. Inversement, dans la pulpe + jus et dans le jus, c'est l'activité de la polyphénoloxydase qui fut environ deux fois plus élevée. Dans les grains (sans pépins) on ne releva pas de différence sensible dans l'activité des deux enzymes. Dans le cas du cépage *Aligoté* on fut en présence à peu près des mêmes phénomènes. Il faut noter, cependant, que la différence entre l'activité des deux enzymes dans les pellicules des grains était plus faible que celle des mêmes enzymes dans la pulpe + jus et dans le jus et cela au profit toujours de la polyphénoloxydase.

On ne note pas une telle différence d'activité des deux enzymes dans les pellicules du raisin des cépages *Dimiat* et *Riesling*. Cependant dans la pulpe + jus, et séparément dans le jus, la différence d'activité des enzymes est grande et toujours au profit de la polyphénoloxydase.

La dynamique des sucres et l'acidité de titration attestent qu'en 1967 les cépages *Muscat rouge* et *Dimiat* ont atteint leur maturité physiologique entre le 25 septembre et le 2 octobre et les cépages *Riesling* et *Aligoté* — entre le 18 et le 25 septembre. Au moment de cette maturité l'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase dans les pellicules des cépages envisagés présentait les valeurs suivantes : *Muscat rouge* : 45,31 et 62,92, *Riesling* : 41,45 et 48,70, *Aligoté* : 43,71 et 60,95, *Dimiat* : 35,14 et 30,73 mg de purpurogalline par gramme d'extrait sec absolu. Dans la pulpe + jus pris ensemble, l'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase est respectivement : *Muscat rouge* 5,88 et 3,26 ; *Riesling* 5,41 et 3,22 ; *Aligoté* 8,51 et 1,77 et *Dimiat* 4,00 et 2,15 mg de purpurogalline par gramme d'extrait sec absolu. Dans le jus, l'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase est bien moins élevée et présente les valeurs suivantes : *Muscat rouge* 4,63 et 2,35 ; *Riesling* 4,04 et 1,17 ; *Aligoté* 2,02 et 1,15 ; *Dimiat* 3,24 et 0,16 mg de purpurogalline par gramme d'extrait absolu.

La différence d'activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase dans le raisin des cépages mentionnés est donc évidente. Elle varie aussi avec les conditions climatiques de l'année de culture.

Les données fournies par nos recherches montrent que la polyphénoloxydase,

tout comme la peroxydase, sont adsorbées en premier lieu par les pellicules du raisin et qu'une partie minime seulement en est dissoute dans le jus. L'activité des enzymes dans le jus est en rapport aussi avec le mode d'obtention du moût, plus précisément avec la quantité de pulpe transférée dans le jus qui possède une activité enzymatique plus élevée.

Les données obtenues, sur l'activité de ces deux oxydases, font donc voir que le degré d'oxydation du moût varie avec le cépage, le mode d'obtention du moût — traité ou non — avant fermentation par des moyens inactivants. Par conséquent, dans la technologie de préparation de la matière première des vins mousseux et des vins blancs de table, il faut tenir compte de la présence dans le raisin de polyphénoloxydase et de peroxydase qui catalysent l'oxydation du moût.

CONCLUSION

Les résultats de notre étude sur la polyphénoloxydase et la peroxydase dans le raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté* montrent que l'activité de ces deux oxydases dans les différentes parties du raisin, est la plus intense au moment de la véraison en masse du raisin. Cette activité baisse au fur et à mesure que le raisin mûrit.

Dans la période de maturation (21 août-11 octobre) l'activité des deux enzymes est la plus intense dans les pellicules, puis dans la pulpe + jus et la moins intense dans le jus du raisin. Pendant toute la durée de nos recherches nous avons observé que pour le cépage *Muscat rouge* l'activité de la peroxydase est environ deux fois plus élevée que celle de la polyphénoloxydase. Dans le cas du cépage *Aligoté*, on observe approximativement les mêmes phénomènes, à ceci près, que la différence d'activité des deux enzymes dans les pellicules des grains est plus faible. Quant aux cépages *Dimiat* et *Riesling* on n'y observe pas de différence sensible d'activité des deux enzymes dans les pellicules du raisin.

Dans la pulpe + jus et dans le jus seul de tous les cépages sur lesquels ont porté nos essais, on a constaté que l'activité de la polyphénoloxydase est plus élevée que celle de la peroxydase.

Reçu pour publication en octobre 1968.

SUMMARY

THE OXIDATION OF GRAPE MUST.

III. — POLYPHENOLOXIDASE AND PEROXIDASE ACTIVITIES DURING RIPENING OF THE GRAPE IN THE « MUSCAT ROUGE », « DIMIAT », « RIESLING » AND « ALIGOTÉ » VARIETIES

Polyphenoloxidase and peroxidase are important oxidation systems in the grape. We have determined the polyphenoloxidase activity by the purpurogallin method, modified by KEILLIN and MANN (1938). The peroxidase activity was determined by the purpurogallin method of WILLSTÄTTER and STOLL (1918), by subtracting from the total activity, thus obtained, the previously determined polyphenoloxidase activity.

The results of our studies of the polyphenoloxidase and peroxidase activities in grapes of the *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* and *Aligoté* varieties show that the activities of these two oxidases, in the different parts of the grain, is highest at the moment of mass early ripening of the grape. The activity falls as the grain ripens.

During the ripening period 21 August to 11 October the activity of the two enzymes was highest in the skin of the grape, followed by the pulp and juice together and least intensive in the juice alone.

Throughout the period of the experiments, in the skin of the grape of the *Muscat rouge* variety the peroxidase activity was twice as high as that of the polyphenoloxidase. In the case of the *Aligoté* variety approximately the same phenomenon was observed, except that the difference in the activities in the grape skin was less. As regards the *Dimiat* and *Riesling* varieties, no appreciable difference was observed in the activities of the two enzymes in the skin of the grape.

In the pulp and juice together and in the juice alone of all the varieties studies the polyphenoloxidase activity was shown to be higher than that of the peroxidase.

RESUMEN

ACERCA DE LA OXIDACIÓN DEL MOSTO DE UVA.

III. — ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA Y DE LA PEROXIDASA DURANTE LA MADURACIÓN DE LA UVA DE LAS CEPAS « MOSCATEL ROJA », « DIMIAT », « RIESLING » Y « ALIGOTÉ »

La polifenoloxidasa y la peroxidasa constituyen importantes sistemas oxidativos de la uva. Hemos determinado la actividad de la polifenoloxidasa por el método de la purpurogalina, modificada por KEILLIN y MANN (1938). La actividad de la peroxidasa quedo a su vez determinada por el método de la purpurogalina de WILLSTÄTTER y STOLL (1918), después de haber disminuido de la actividad total así obtenida, la actividad de la polifenoloxidasa.

Los resultados de nuestros estudios acerca de la polifenoloxidasa y de la peroxidasa en la uva de las cepas *Moscatel roja, Dimiat, Riesling* y *Aligoté* permiten apreciar que la actividad de estas dos oxidasas, en las distintas partes de la uva, es más elevada en el momento del envero en masa de la uva. Esta actividad va disminuyendo a medida que la uva madura.

Durante el periodo de maduración — 21 de agosto al 11 de octubre — la actividad de las dos enzimas es más elevada en las pieles, y acto seguido, en la pulpa + zumo y la menos intensa en el zumo de uva.

Durante toda la duración de los ensayos, las pieles de la uva de las cepas *Moscatel roja,* han manifestado en cuanto a la peroxidasa una actividad dos veces aproximadamente más elevada que en cuanto a la polifenoloxidasa. En el caso de la cepa *Aligoté,* nos encontramos poco mäs o menos en presencia de los mismos fenómenos, salvo por lo que se refiere a la diferencia de actividad de ambas enzimas en las pieles de los granos, que es más débil.

Por lo que respecta a las cepas *Dimiat* y *Riesling* no se observa una diferencia apreciable de actividad en las pieles de la uva.

En la pulpa + zumo y en el zumo solo de todas las cepas estudiadas, la actividad de la polifenoloxidasa ha manifestado ser más elevada que aquella de la peroxidasa.

RIASSUNTO

SULL'OSSIDAZICHE BIOLOGICA DEL MOSTO D'UVA.

III. — ATTIVITÄ DELLA POLIFENOLOSSIDASI E DELLA. PEROSSIDASI NEL CORSO DELLA MATURAZIONE DELL'UVA DEI VITIGNI « MOSCATO ROSSO » « DIMIAT » « RIESLING » E « ALIGOTÉ »

La polifenolossidasi e la perossidasi sono degli importanti sistemi ossidativi dell'uva. Noi abbiamo determinato l'attivitä della polifenolossidasi col metodo alla purpurogallina, modificato da KEILLIN e MANN (1938). L'attività della perossidassi fu determinata col metodo alla purpurogallina di WILLSTÄTTER e STOLL (1918), dopo avere eliminata dall'attività totale cosi ottenuta, la attività della polifenolossidasi.

I risultati dei nostri studi sulla polifenolossidasi e la perossidasi nell'uva dei vitigni *Moscato rosso*, *Dimiat*, *Riesling* e *Alligoté* fanno vedere che l'attività di queste due ossidasi, nelle diverse parti dell'uva, è la piu elevate al momento dello vsiluppo in massa dell'uva. Questa attività scema a mano a mano che l'uva matura.

Nel periodo di maturazione2 (1 agosto-11 ottobre), l'attiivtà dei due enzimi è la più elevata nelle pellicole, poi nella polpa succo e la meno intensa nel succo dell'uva.

Durante tutta la durata delle prove, nelle pellicole dell'uva del vitigno *Moscato rosso*, la perossidasi ha manifestato una attività circa due volte più elevate di quella della polifenolossidasi. Nel caso del vitigno *Aligoté*, si è stati approssimativamente in presenza degli stessi fenomeni, solo che la differenza d'attività dei due enzimi nelle pellicole dei grani è più debole. In quanti ai *Dimiat* e *Riesling*, non vi si osserva una differenza sensibile d'attivitá nelle pellicole dell'uva.

Nella polpa + Succo e nel succo solo di tutti i vitigni studiati, l'attivit dellaà polifenolossidasi si rivelo più elevata di quella della perossidasi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bokoutchava M., 1948. Nouvelles méthodes de détermination de la peroxydase en présence de polyphénoloxydase et de catalase. *Biokhimija*, **13**, n° 4, 360.

Böttcher H., 1961. Die activität der Peroxydase und Polyphenol Oxydase in frischem Gemüse. *Lebensmitt. Unters. Forsch.*, 115-6. S 527.

Deibner L., Rifai H., 1963 I. Über die Bestimmung der Aktivität der Polyphenoloxydase mit Hilfte der elektophotometriche Metode mit Purpurogallin. *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein*, 56-70 ; 113-119.

Ivanov T., 1966 *a*. Activité de la polyphénoloxydase au cours de la maturation du raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté*. *Viticulture et vinification*, **15** (2), 24-27.

Ivanov T., 1966 *b*. Nouvel essai d'étude comparée de l'anhydride sulfureux et de la bentonite en tant qu'inactivateurs de la polyphénoloxydase du moût de raisin. *Viticulture et vinification*, **15** (4), 28-32.

Ivanov T., 1967 *a*. Activité de la polyphénoloxydase du raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté*. *Ann. Technol. agric.*, **16** (1), 35-39.

Ivanov T., 1967 *b*. Étude comparée de l'anhydride sulfureux et de la bentonite en tant qu'inactivateurs de la polyphénoloxydase du moût de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **16** (2), 81-88.

Keillin D., Mann T., 1938. Polyphenoloxydase, purification nature and properties. *Proc. r. Soc. ser.*, **1245**, 187.

Poux C. Enzymes oxydatifs dans le raisin, d'après les matériaux des *Journées scientifiques*, Paris le 23-26 janvier 1967.

Willstätter R., Stoll A., 1918. Über die peroxydase. *Iustus Liebigs. Ann. Chem.*, **416**, 21.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 341-354.

MÉTHYLESTÉRIFICATION SÉLECTIVE DES ACIDES GRAS LIBRES ET DES ACIDES GRAS DES GLYCÉRIDES

Simone KUZDZAL-SAVOIE
avec la collaboration technique de D. LANGLOIS

Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié les diverses conditions permettant d'estérifier sélectivement ; soit les acides gras des triglycérides, soit les acides gras libres, dans un mélange lipidique contenant ces deux groupes de composés.

Si l'estérification sélective des acides gras des triglycérides est possible, celle des acides gras libres ne l'est pas, une fraction faible mais cependant toujours notable des acides gras des triglycérides subissant l'estérification dans le même temps.

Il est bien connu que la préparation des esters méthyliques est rapide en milieu acide lorsque les acides gras sont libres et rapide en milieu alcalin lorsque les acides gras proviennent des glycérides.

Utilisant ces données, LOURY (1967) a proposé une méthode générale d'estérification des acides gras, applicable aux corps gras acides.

Dans le domaine des produits laitiers on se trouve souvent en présence de graisses acides, provenant par exemple de laits ou de beurres rances ou de fromages affinés. Mais plutôt que de déterminer les proportions relatives des acides gras totaux, on préfère généralement connaître — afin par exemple de déterminer l'origine d'une lipolyse — les proportions relatives des acides gras dans les glycérides d'une part et dans les acides libres d'autre part et ceci de la manière la plus simple possible.

Nous avons donc étudié la possibilité de préparer sélectivement, d'une part les esters méthyliques des acides gras libres, et d'autre part les esters méthyliques des acides gras des glycérides en opérant directement sur un échantillon lipidique comprenant ces deux groupes de composés.

TABLEAU I

Première série d'essais — Conditions expérimentales

Composition du mélange	Essai I				Essai II				Essai III				Essai IV			
	1	2	3	4	A	B	C	D	*a*	*b*	*c*	*d*	α	β	γ	δ
Glycérides (en g)	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1				
12 : 0 (en g)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,102	0,103	0,102	0,109
14 : 0	0,104	0,086	0,087	0,102	0,077	0,080	0,097	0,069	—	—	—	—	0,100	0,104	0,083	0,099
16 : 0	0,105	0,108	0,107	0,107	0,071	0,076	0,052	0,075	—	—	—	—	0,099	0,106	0,101	0,110
18 : 2	0,106	0,124	0,115	0,134	0,068	0,069	0,075	0,071	—	—	—	—	—	—	—	—
Solution*	alc.	alc.	ac.	ac.	alc.	alc.	ac.	ac.	ac.	ac.	ac.	ac.	alc.	alc.	alc.	alc.
Volume en ml)	10 + 10**	10 + 10**	10 + 10**	10 + 10**	10	10	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10
Temps (en mn)	30 + 30	30 + 30	30 + 30	30 + 30	30	30	30	30	5	10	5	10	5	10	5	10
Agitation	3 sec/10 mn				3 sec/5 mn				2 sec/mn				2 sec/mn			
Aspect***	hét.	hom.	hét.	hét.	hét.	hét.	hét.	hét.	hét.	hét.	hét.	hét.	hom.	hom.	hom.	hom.

* *Solutions* : alcaline : solution d'hydroxyde de potassium à 0,35 p. 100.
acide : solution méthanolique d'acide sulfurique à 3 p. 100.

** Après 30 mn on a ajouté 10 ml de solution et on a prolongé l'estérification 30 mn.
Température uniforme : 75°C.

*** Aspect : homogène ou hétérogène.

PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS

Des mélanges connus d'acides gras libres (contenant moins de 1 p. 100 d'impuretés) et d'huile de beurre ont été soumis à l'estérification dans diverses conditions. Ces conditions sont indiquées dans le tableau 1.

On a utilisé des tubes droits de 50 ml de capacité, surmontés d'une canne de verre jouant le rôle de réfrigérant ascendant. En fin d'opération et après refroidissement on a ajouté dans tous les tubes, 10 ml d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 5 p. 100 et 3 ml de pentane.

Le contenu du tube a été agité puis laissé au repos. La couche de pentane a été recueillie. Après évaporation du solvant, un extrait pentanique a été obtenu pour tous les tubes des essais I, II et III, mais aucun extrait pentanique n'était décelable pour les tubes de l'essai IV.

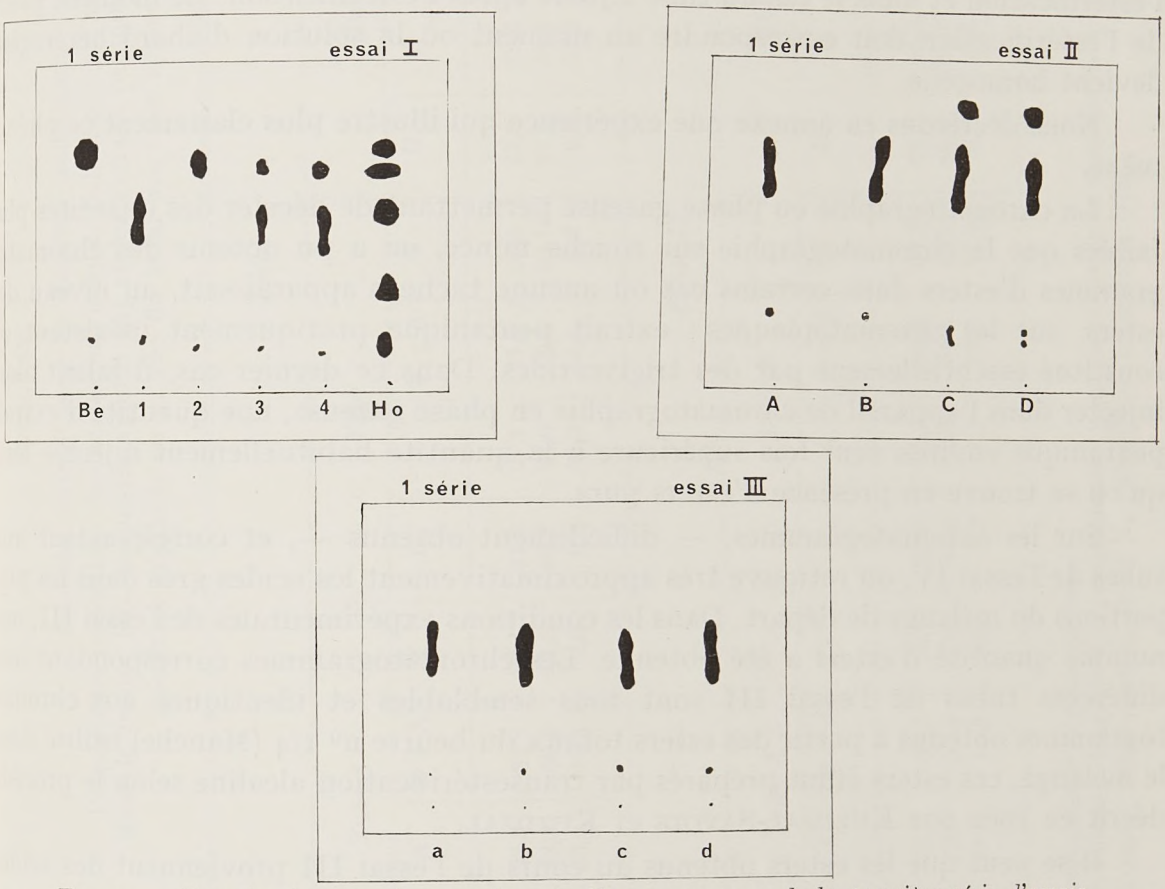


FIG. 1. — *Reproduction des chromatoplaques obtenues au cours de la première série d'essais*

Essai I. — De gauche à droite : esters méthyliques totaux de beurre (B) ; extraits pentaniques des tubes 1, 2, 3 et 4 ; mélange témoin Hormel (de bas en haut : lécithine, cholestérol, trioléine, oléate de méthyle, oléate de cholestérol).

Essai II. — Extraits pentaniques des tubes A, B, C et D.

Essai III. — Extraits pentaniques des tubes *a*, *b*, *c* et *d*.

Conditions de l'analyse. — Plaques 20 cm × 20 cm, couche de silicagel G 0,25 mm ; solvant de développement : éther de pétrole, oxyde d'éthyle, acide acétique (80/20/1).

Les extraits pentaniques ont été analysés ensuite par chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase gazeuse.

On a présenté sur la figure 1 les différentes images obtenues au cours de l'analyse

des extraits pentaniques par chromatographie sur couche mince. D'une façon générale aucune tache correspondant à des acides libres n'a été observée. Ceux-ci ont donc été, soit transformés en savons, soit estérifiés.

Si l'on se basait sur les seuls résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince on serait tenté de dire qu'il ne se produit pas d'estérification sur les acides libres en milieu alcalin (essai IV) ni sur les acides des glycérides en milieu acide dans les conditions de l'essai III, ni sur les acides des glycérides en milieu alcalin avant un certain temps. Et dans ce dernier cas, lorsque l'estérification se produit, elle est instantanément totale.

En effet dans les conditions de l'essai II, les tubes A et B ne contiennent pas d'esters et dans les conditions de l'essai I, le tube 1 n'en contient pas non plus. Dans le tube 2 au contraire tous les acides gras des glycérides ont été estérifiés. Or, les durées d'estérification sont identiques pour les tubes 1 et 2 de l'essai I ; seule l'agitation a pu être légèrement différente. On se trouve donc dans le cas du tube 1 juste avant l'estérification et dans le cas du tube 2 juste après l'estérification. Le moment précis de l'estérification doit correspondre au moment où la solution d'abord hétérogène devient homogène.

Nous décrivons en annexe une expérience qui illustre plus clairement ce phénomène.

La chromatographie en phase gazeuse permettant de déceler des quantités plus faibles que la chromatographie sur couche mince, on a pu obtenir des chromatogrammes d'esters dans certains cas où aucune tache n'apparaissait, au niveau des esters, sur les chromatoplaques : extrait pentanique pratiquement inexistant ou constitué essentiellement par des triglycérides. Dans ce dernier cas, il fallait alors injecter dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, une quantité d'extrait pentanique environ cent fois supérieure à la quantité habituellement injectée lorsqu'on se trouve en présence d'esters purs.

Sur les chromatogrammes, — difficilement obtenus —, et correspondant aux tubes de l'essai IV, on retrouve très approximativement les acides gras dans les proportions du mélange de départ. Dans les conditions expérimentales de l'essai III, une minime quantité d'esters a été obtenue. Les chromatogrammes correspondant aux différents tubes de l'essai III sont tous semblables et identiques aux chromatogrammes obtenus à partir des esters totaux du beurre n° 1/4 (Manche) utilisé dans le mélange, ces esters étant préparés par transestérification alcaline selon le procédé décrit en 1962 par KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL.

Il se peut que les esters obtenus au cours de l'essai III proviennent des acides gras libres que tout beurre, même frais, contient (0,1 g p. 100 g environ), et dont la composition est très généralement identique à celle des acides gras des triglycérides.

Les résultats sont plus complexes pour les essais I et II. Ils ont été rassemblés dans le tableau 2. On a considéré seulement les trois acides suivants : myristique, palmitique et linoléique.

Les proportions relatives de ces trois acides sont connues dans le beurre (B) et sont aussi connues dans les mélanges d'acides gras ajoutés (A). Il est donc possible de les calculer dans le mélange beurre et acides ajoutés (B + A). Ces diverses proportions peuvent alors être comparées à celles trouvées dans les différents extraits pentaniques.

TABLEAU 2

Première série d'essais — Résultats analytiques

Proportions respectives des acides myristique, palmitique et linoléique dans le beurre (B), les acides ajoutés (A) et les extraits pentaniques (T).

Résultats exprimés en p. 100 du total des trois acides

Essai I

Acides	Tube 1				Tube 2				Tube 3				Tube 4			
	B	A	B + A	T	B	A	B + A	T	B	A	B + A	T	B	A	B + A	T
14 : 0	27,8	33,3	29,3	29,5	27,8	27,1	27,4	28,6	27,8	28,2	27,8	29,5	27,8	29,7	28,4	30,7
16 : 0	66,2	33,3	56,2	61,5	66,2	34,0	56,2	65,1	66,2	34,6	56,6	48,5	66,2	31,2	54,7	44,6
18 : 2	6,0	33,4	14,5	9,0	6,0	38,9	16,4	6,3	6,0	37,2	15,6	22,0	6,0	39,1	17,0	24,7

Essai II

Acides	Tube A				Tube B				Tube C				Tube D			
	B	A	B + A	T	B	A	B + A	T	B	A	B + A	T	B	A	B + A	T
14 : 0	27,8	35,6	30,7	26,3	27,8	35,5	30,8	23,7	27,8	43,3	33,2	43,0	27,8	32,1	28,7	32,7
16 : 0	66,2	32,9	53,5	55,0	66,2	33,8	53,5	48,7	66,2	23,2	49,8	26,7	66,2	34,9	54,8	36,5
18 : 2	6,0	31,5	15,8	18,7	6,0	30,7	15,7	27,6	6,0	33,5	17,0	30,4	6,0	33,0	16,5	30,8

Conditions de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Appareil Aerograph HyFi 600 C. Colonne : longueur 3 m ; diamètre int. : p 0,3 cm ; chargée de chromosorb W lavé aux acides imprégné de succinate de diéthyléneglycol au taux de 10 p. 100. Température : 180°C environ. Débit N_2 : 25 ml/mn. Intégration DISC.

Lorsqu'on se trouve en milieu alcalin et sans qu'il y ait d'estérification notable (pas de traces d'esters sur la chromatoplaque), l'estérification très faible qui se produit porte sur les acides gras des triglycérides et sur les acides libres où elle s'exerce préférentiellement sur l'acide linoléique. Le phénomène est plus net pour les tubes A B de l'essai II que pour le tube 1 de l'essai I. Les conditions d'estérification sont d'ailleurs légèrement différentes. Mais s'il y a eu, en milieu alcalin, estérification complète (disparition des triglycérides : tube 2 de l'essai I), on constate que celle-ci porte pratiquement sur les acides gras des triglycérides seuls puisque les proportions relatives des trois acides retenus sont, dans les esters analysés, identiques aux proportions relatives de ces acides dans le beurre lui-même.

Lorsqu'on se trouve en milieu acide, l'estérification porte préférentiellement sur les acides libres : ainsi dans les tubes C et D de l'essai II, les esters obtenus sont constitués essentiellement par les esters myristique, palmitique et linoléique. Les proportions relatives de ces esters sont très voisines des proportions relatives des acides libres dans le mélange de départ. Mais plus la réaction se prolonge, plus la proportion d'esters provenant des acides gras des triglycérides s'accroît : les tubes 3 et 4 de l'essai I contiennent davantage d'esters provenant des acides des glycérides que les tubes C et D de l'essai II. Ceci se manifeste par l'apparition sur les chromatogrammes des pics correspondant aux acides stéarique et oléique et à divers acides mineurs du beurre. Dans le même temps on observe que plus il y a d'estérification des acides gras des glycérides plus le rapport $\frac{18:1}{18:0}$ s'accroît.

Ainsi cette première série d'essais permet d'affirmer que l'on peut préparer sélectivement les esters méthyliques des acides gras des glycérides à partir d'un mélange de glycérides et d'acides gras libres en se plaçant en milieu alcalin (en utilisant par exemple la solution définie ci-dessus : solution méthanolique d'hydroxyde de potassium à 3,5 p. 100), à une température voisine de 75°C, sous une bonne agitation et en poursuivant la réaction jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

La seconde série d'essais a pour objectif de rechercher les conditions d'estérification sélective des acides libres en présence des glycérides, conditions qui n'ont pu être précisées au cours de la première série d'essais.

Des mélanges connus de graisse de beurre et d'acides gras libres ont été à nouveau préparés. La composition des mélanges ainsi que les conditions d'estérification sont indiquées sur le tableau 3.

Dans les essais I et II de cette seconde série d'essais, les esters ont été séparés des glycérides non modifiés par chromatographie sur couche mince à partir des extraits pentaniques. Dans les essais III et IV, après estérification et refroidissement, la solution méthanolique contenant les esters a été séparée des glycérides par simple décantation. Les esters ont été ensuite isolés après addition à la solution méthanolique, de 10 ml de solution aqueuse de carbonate de potassium et 3 ml de pentane.

TABLEAU 3

Deuxième série d'essais — Conditions expérimentales

	I				II				III		IV	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	1	2
Glycérides (g)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acides (mg)												
12 : 0					74,6	78,7	75,1	76,1	77,4	77,7	76,4	76,1
14 : 0	77,9	72,0	73,1	76,8	80,6	76,9	75,0	78,8	77,4	74,7	82,0	30,5
16 : 0	75,9	71,6	76,0	75,9	74,7	74,4	57,1	75,3				
18 : 0	13,4	12,8	14,9	13,4					76,4	74,9	76,8	76,7
18 : 1 (vacc.)	59,4	57,1	65,9	69,8								
Temps (mn)	10	10	20	20	10	10	20	20	10	20	5	5

Estérification en milieu acide (10 ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 0,3 p. 100, p/p à 75°C avec agitation de quelques secondes toutes les minutes.

I et II : Isolement des esters, par chromatographie sur couche mince de l'extrait pentanique.

III et IV : Isolement des esters par décantation de la solution méthanolique avant addition de la solution de carbonate de potassium (5 p. 100) et du pentane (3 ml).

Les résultats analytiques ont été rassemblés dans le tableau 4.

On constate en étudiant les résultats se rapportant aux essais I et II que la similitude est légèrement plus grande, entre les proportions relatives des acides libres dans le mélange de départ et des acides estérifiés pour les essais à 10 minutes que pour les essais à 20 minutes. Ceci résulte au moins partiellement d'une estérification plus importante des acides gras provenant des triglycérides du beurre dans les essais à temps prolongé. Ceci entraîne dans le mélange d'esters obtenu une diminution de la proportion d'un acide, — tel l'acide laurique —, qui existe dans le beurre à un faible taux (3 p. 100 environ) et une augmentation de la proportion d'acide palmitique, constituant majeur de la graisse de beurre.

On relève également une estérification préférentielle de l'acide stéarique provenant des glycérides. Ainsi dans l'essai II la surface du pic de l'acide stéarique est plus grande que la surface du pic de l'acide oléique lorsque l'estérification dure 10 mn alors que le rapport des surfaces s'inverse pour une estérification prolongée pendant 20 mn. Ce point a déjà été signalé au cours de la première série d'essais.

Ainsi on n'obtient pas, même avec un temps de réaction réduit (10 mn) une estérification sélective sur les seuls acides gras libres.

De plus l'isolement par chromatographie préparative sur couche mince des esters est une technique longue qui confère à la méthode une grande lourdeur.

Les essais III et IV ont été effectués en vue de simplifier la méthode précédemment décrite.

TABLEAU 4

Deuxième série d'essais — Résultats analytiques

A : Proportions relatives des acides gras libres dans le mélange de départ (avant) et des acides gras estérifiés (après)

B : Proportion de graisse de beurre transformée

Acides	I								II							
	1		2		3		4		1		2		3		4	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
A 12 : 0									32,4	30,5	34,2	33,3	36,2	32,1	33,1	27,0
A 14 : 0	34,4	33,2	33,7	29,2	31,8	27,7	34,0	29,6	35,0	34,6	33,4	32,6	36,2	33,6	34,2	34,0
A 16 : 0	33,5	33,3	33,5	35,3	33,1	33,1	33,6	34,5	32,5	34,9	32,4	34,1	27,6	34,2	32,7	39,0
A 18 : 0	5,9	7,9	6,0	9,1	6,5	10,0	5,9	9,1	—	—	—	—	—	—	—	—
A 18 : 1 (vacc.)	26,2	25,6	26,7	26,4	28,6	29,2	26,5	26,8	—	—	—	—	—	—	—	—
B	—	—	—	—	—	—	—	—	5,3 %		5,7 %		9,3 %		11,0 %	

Acides	III								IV							
	1				2				1				2			
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
A 12 : 0	33,5	42,6	50,0	54	34,2	41,5	51	52	32,5	39,2	48	52	32,6	36,9	48,5	51
A 14 : 0	33,5	36,3	50,0	46	32,9	37,0	49	48	34,8	36,0	52	48	34,5	35,5	51,5	49
A 18 : 0	33,0	21,0	—	—	32,9	21,5	—	—	32,7	24,7	—	—	32,9	27,6	—	—
B	11,6 %				14,9 %				6,5 %				7,5 %			

Dans les conditions expérimentales utilisées, les triglycérides ne sont que peu touchés et se solidifient au cours du refroidissement ce qui permet leur isolement par décantation de la solution méthanolique contenant les esters.

L'analyse par chromatographie sur couche mince révèle que les glycérides ainsi isolés ne contiennent pratiquement pas d'esters, que les esters isolés de la solution méthanolique (après addition de la solution de carbonate de potassium et d'un peu de pentane) ne contiennent pas de triglycérides et qu'aucune tache notable d'acides gras libres n'apparaît dans l'une ou l'autre fraction. Cependant les résultats obtenus après analyse par chromatographie en phase gazeuse des mélanges d'esters, montre peu de concordance entre les proportions relatives des acides libres dans le mélange de départ et des acides estérifiés : la proportion d'acide stéarique est très abaissée alors que celle de l'acide laurique est nettement accrue.

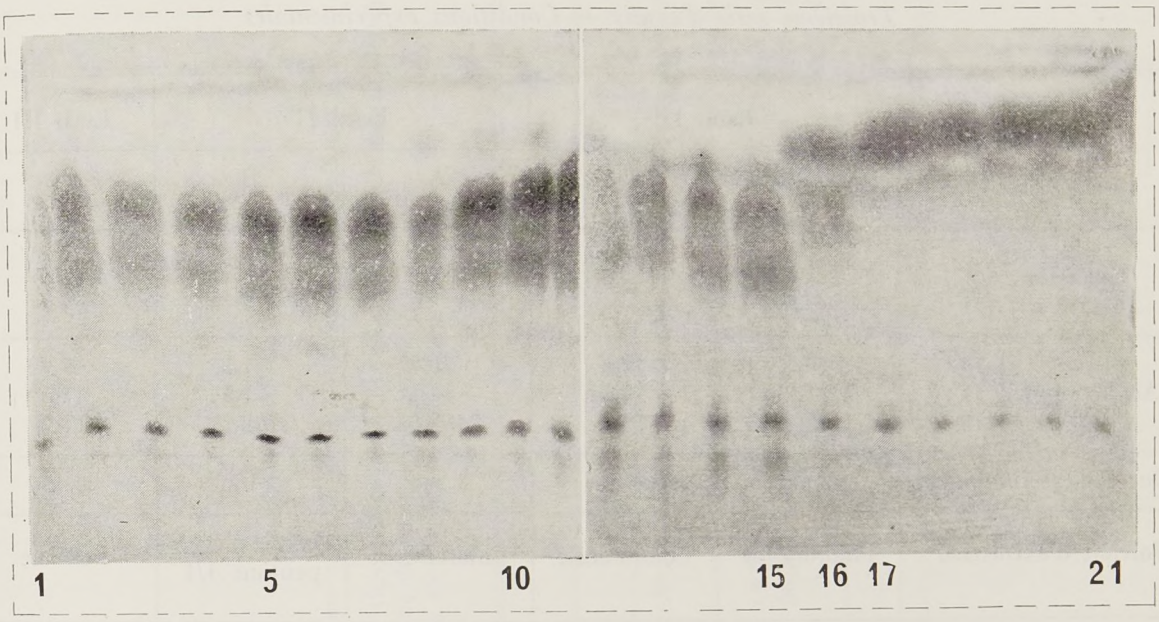


FIG. 2. — *Analyse par chromatographie sur couche mince des extraits pentaniques correspondant aux prélèvements effectués toutes les 3 minutes*

La transestérification a lieu entre le 15e et le 16e prélèvement. Elle est terminée au 17e prélèvement.
1-15 : triglycérides.
16 : triglycérides + esters méthyliques.
17-21 : esters méthyliques.
La solution devient homogène entre le 19e et le 20e prélèvement.
Conditions de l'analyse : conférer la légende de la figure 1.

En fait si la comparaison porte seulement sur les acides laurique et myristique, les différences sont beaucoup plus faibles. L'erreur porte donc essentiellement sur l'acide stéarique, qui possède sans doute dans les conditions analytiques utilisées un comportement particulier.

Ce point sera étudié lors d'une troisième série d'essais.

Les résultats obtenus au cours de cette seconde série d'essais ne nous permettent pas de proposer un protocole expérimental qui conduirait à une estérification sélective des acides gras libres en opérant directement sur un mélange triglycérides-acides libres. En effet nous n'avons pas réussi à éviter une estérification partielle des acides gras provenant des triglycérides.

TROISIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Celle-ci est destinée à préciser en premier lieu le comportement particulier de l'acide stéarique au cours de l'estérification dans les conditions décrites, et en second lieu à conduire à un protocole expérimental permettant de résoudre le problème encore posé de l'estérification sélective des acides gras libres en présence des glycérides.

De nouvelles conditions analytiques ont été choisies. Elles sont indiquées dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Troisième série d'essais — Conditions expérimentales

	Essai I		Essai II		Essai III
	1	2	A	B	
Glycérides (g) (beurre n° 1/5)	1	1	1	1	
Acides (mg) 12 : 0	86,4	72,8	70,7	71,5	67,0
Acides (mg) 14 : 0	81,2	75,5	84,1	71,4	72,3
Acides (mg) 18 : 0	84,1	75,8	104,0	102,2	68,7
Durée d'estérification	3 mn	10 mn	3 mn	3 mn	30 mn
Solvant d'extraction	Chloroforme	Chloroforme	Chloroforme	Oxyde d'étyle pentane 1/1	Pentane

L'estérification est effectuée par une solution méthanolique d'acide sulfurique à 3 p. 100.
Une agitation intermittente toutes les 1/2 mn est assurée.
La séparation des triglycérides et des esters est effectuée par décantation.

On se trouve en présence dans les essais I et II de cette troisième série, d'un mélange triglycérides-acides gras, alors que dans l'essai III, un simple mélange d'acides gras est utilisé. L'estérification est obtenue toujours au moyen d'une solution méthanolique d'acide sulfurique, à 3 p. 100, dans des conditions variables de durée.

Dans les essais I et II, on procède en fin d'opération à une séparation des triglycérides et des esters par décantation de la solution méthanolique. Divers solvants ont été utilisés pour extraire les esters.

Les résultats analytiques obtenus sont rassemblés dans le tableau 6.

L'examen des résultats permet d'affirmer que la nature du solvant utilisé pour l'extraction des esters n'est pas un facteur permettant d'expliquer la faible proportion d'ester stéarique récupérée puisque la même constatation s'impose, que les esters soient extraits au moyen de chloroforme ou au moyen de pentane.

TABLEAU 6

Troisième série d'essais — Résultats analytiques

A : Proportions relatives des acides gras libres dans le mélange de départ (avant) et des acides estérifiés (après)

B : Proportion de graisse de beurre transformée

Acides	Essai I								Essai II								Essai III			
	1				2				A				B							
	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.	Av.	Apr.
A 12 : 0	34,3	42,8	51,6	55,0	32,5	39,2	49,1	52,0	27,3	36,4	45,6	51,2	29,2	38,1	50,1	55,2	32,2	35,4	48,1	53,0
A 14 : 0	32,3	33,6	48,4	45,0	33,7	36,0	50,9	48,0	32,5	34,6	54,4	48,8	29,1	30,9	49,9	44,8	34,8	30,7	51,9	47,0
A 18 : 0	33,4	23,6	—	—	33,8	24,8	—	—	40,2	29,0	—	—	41,7	31,0	—	—	33,0	33,9	—	—
B %	3				7				1,5				1,7							

Par ailleurs, on retrouve dans les acides estérifiés la proportion d'acide stéarique du mélange de départ lorsqu'il s'agit d'une estérification portant sur les seuls acides libres, et ceci en utilisant le pentane comme solvant d'extraction.

Ainsi tout porte à penser que lorsque l'acide stéarique est un constituant du mélange, on se trouve en présence d'une estérification incomplète. Il devrait être alors possible de retrouver trace de l'acide non estérifié.

Dans les essais III et IV de la deuxième série d'essais (en nous basant sur un résultat de chromatographie sur couche mince) nous n'avions pas trouvé d'acides libres dans les glycérides ni dans la solution méthanolique d'esters, après séparation de ces deux fractions par décantation.

La comparaison de la proportion d'acide stéarique dans le mélange de départ d'une part et dans les esters d'autre part, révèle une perte d'environ 20 à 30 p. 100 de l'acide stéarique incorporé, ce qui correspond à environ 20 mg. Évalués par rapport aux triglycérides présents, ces 20 mg représentent une proportion voisine de 2 p. 100, c'est-à-dire une proportion très proche de la limite de sensibilité de la méthode de détection par chromatographie sur couche mince. Ceci peut expliquer que l'on n'ait pas décelé la présence d'acide stéarique non estérifié au cours des essais III et IV de la deuxième série d'essais.

Au cours de la troisième série d'essais, dans l'essai II par exemple, comportant une estérification de trois minutes, on a constaté, lors de la décantation de la solution méthanolique, après estérification, la présence d'un léger dépôt blanc mêlé aux glycérides.

Ce dépôt blanc a été spécifiquement étudié. Après addition d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,3 p. 100 au mélange glycérides et dépôt blanc, et d'une quantité équivalente d'eau, la solution hydroalcoolique a été séparée, puis acidifiée et extraite au benzène.

L'analyse par chromatographie sur couche mince de cet extrait a révélé la présence d'une très forte proportion d'acides gras libres. Après estérification en milieu acide, de cet extrait, l'analyse des esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse, a révélé une proportion prépondérante d'acide stéarique.

Ainsi, l'estérification en milieu acide dans un temps réduit (trois minutes par exemple), permet d'abaisser à une quantité négligeable (1,5-1,7 p. 100) la proportion des acides gras des glycérides touchés par l'estérification mais, dans ces conditions, les acides libres ne sont plus estérifiés quantitativement.

Cela est particulièrement net lorsque le mélange des acides contient de l'acide stéarique dont la solubilité dans l'alcool méthylique est sans doute incomplète dans les conditions d'agitation et de température utilisées dans la présente étude.

CONCLUSION

L'étude développée ci-dessus ne nous a pas permis d'aboutir à un protocole expérimental simple, permettant une estérification sélective et quantitative des acides gras libres dans un mélange acides gras-triglycérides.

Par contre, l'estérification sélective des acides gras des triglycérides est possible.

Si l'on désire estérifier sélectivement les acides libres, il est préférable de les

isoler auparavant. Cet isolement peut être effectué, par exemple, selon une méthode décrite ailleurs (cf. KUZDZAL et KUZDZAL-SAVOIE, 1966) et que nous avons maintes fois utilisée avec succès.

L'estérification des acides libres peut être, ensuite, effectuée d'une manière très simple, en utilisant une solution méthanolique d'acide sulfurique à 3 p. 100.

Reçu pour publication en septembre 1968.

ANNEXE

Nous avons avancé, lors de l'interprétation des résultats obtenus au cours de la première série d'essais, que l'estérification des acides gras des glycérides par l'alcool méthylique en milieu alcalin, lorsqu'elle se produit, est immédiatement totale.

L'expérience décrite ci-après a pour objet d'illustrer ce phénomène.

Dans un ballon à double tubulure, nous avons placé 7 g d'huile de beurre et 500 mg environ de chacun des acides suivants : acide laurique (517 mg), acide myristique (511 mg), acide palmitique (501 mg). Nous avons ajouté 70 ml de la solution d'hydroxyde de potassium à 0,37 p. 100 (p/v).

Le ballon a été placé sous un réfrigérant ascendant au bain-marie à 75°C. Toutes les trois minutes un prélèvement de 5 ml de surnageant a été effectué (les glycérides ne sont que partiellement solubilisés) suivi d'une agitation du mélange réactionnel pendant 10 secondes.

L'estérification a été lente à se produire et nous avons été contraints d'ajouter deux fois, à la 23^{e} minute et à la 46^{e} minute, 25 ml de la solution méthanolique d'hydroxyde de potassium.

A chaque fraction de 5 ml nous avons ajouté après refroidissement 10 ml de la solution de carbonate de potassium à 5 p. 100 (p/v) et quelques ml de pentane.

Les extraits pentaniques recueillis ont été analysés par chromatographie sur couche mince dans les conditions habituelles.

Le résultat de ces analyses est visible sur la figure 2. Du 1er au 15^{e} prélèvement, c'est-à-dire pendant près de 45 minutes, il semble ne rien se produire. Le surnageant ne contient pratiquement que des triglycérides. On distingue cependant une très faible tache d'esters au-dessus des triglycérides, mais celle-ci ne semble pas évoluer. On décèle à la partie inférieure de la plaque, le cholestérol et les diglycérides.

Lors du 16^{e} prélèvement le surnageant ne contient presque plus de glycérides mais une très forte quantité d'esters méthyliques. A partir du 17^{e} prélèvement les esters sont seuls présents dans le surnageant (avec le cholestérol?).

Cependant ce n'est qu'entre le 19^{e} et le 20^{e} prélèvement que la solution est devenue homogène. L'obtention de cette homogénéité est donc un critère certain d'une estérification complète des acides gras des glycérides.

Si l'estérification des acides gras des triglycérides n'est pas immédiatement totale, elle est cependant très brusque et se produit dans les conditions expérimentales utilisées en un temps qui ne doit pas dépasser 2 ou 3 minutes, peut-être moins.

Les liaisons esters des triglycérides sont sans doute rompues à un moment donné, toutes ensemble, et l'ion glycérolique est immédiatement remplacé par l'ion

méthoxylé. S'il en est bien ainsi, le mélange réactionnel doit contenir du glycérol après estérification des acides gras.

Il serait intéressant de connaître les conditions de milieu qu'exige la transestérification pour se produire ; le temps de latence pourrait ainsi être supprimé.

SUMMARY

SELECTIVE ESTERIFICATION OF GLYCERIDES AND FREE FATTY ACIDS

The authors investigated various conditions whereby, either the triglycerides in fatty acids of the free fatty acids in a lipoid mixture containing these two groups of compounds, can be esterified. While selective esterification of the triglycerides in fatty acids is feasible that of the free fatty acids is not, a small portion but nevertheless noticeable amount undergoing esterification concomitantly.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

KUZDZAL W., KUZDZAL-SAVOIE S., 1966. Étude comparée des acides gras non volatils libres et estérifiés dans les fromages. *17e Congr. intern. Lait*, Munich, D : 2, 335.

KUZDZAL-SAVOIE S., KUZDZAL W., 1962. Variations observées dans les proportions relatives des acides gras du lait de vache pendant la période de mise à l'herbe. *16e Congr. intern. Lait*, Copenhague, I : 1, 270.

LOURY M., 1967. Une méthode générale permettant la transformation rapide des corps gras en esters méthyliques. *Rev. fr. Corps gras*, **14**, 383.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4), 355-377.

MISE AU POINT

PERMÉABILITÉ DES LEVURES AUX SUCRES ET AUX ACIDES AMINÉS

C. DIVIES et J.-N. MORFAUX

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, 21 - Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

Si, dans le cadre de la biologie animale, végétale et de l'agronomie, les phénomènes d'échange entre un organisme et le milieu où il vit ont été depuis toujours l'objet d'observations nombreuses et d'une grande importance, il est remarquable de constater qu'il n'en a pas été de même dans le cas de la microbiologie. C'est seulement depuis 10 ans environ que les étapes primordiales et les lois fondamentales qui régissent les échanges des microorganismes avec le milieu extérieur ont été mises en évidence. Cependant, le physiologiste microbien bénéficie de conditions exceptionnellement favorables. Son matériel biologique est facile à obtenir et il possède une intense activité biochimique.

On peut penser justement, et les récentes grandes découvertes de la biochimie le confirment, que la richesse et le nombre des sujets que l'on peut aborder sur les microorganismes ont abouti à la création, *ipso facto*, d'un certain nombre de priorités. Ainsi l'étude des voies du métabolisme, de la synthèse des protéines et des acides nucléiques a conduit à éliminer méthodiquement, par des traitements violents, tous les problèmes relatifs à la perméabilité cellulaire et au transport des métabolites à travers la membrane cytoplasmique.

Et pourtant, le fait qu'un organisme monocellulaire développe des activités physiologiques et génétiques qui lui sont propres est évidemment lié à la présence d'une barrière enveloppant les constituants cellulaires et les séparant du milieu extérieur. Ceci entraîne pour cet organisme, l'obligation de correspondre avec ce qui l'entoure, dans un sens comme dans l'autre, au moyen de mécanismes d'échanges hautement spécifiques et par le fait même spécialisés.

Toutefois, l'étude fondamentale de ces échanges n'a été rendue possible que par l'utilisation des éléments marqués et l'obtention de mutants biochimiques. Ainsi on savait déjà que certains microorganismes intacts ne pouvaient dégrader certains sucres ou acides organiques (lactose ou acide citrique par exemple) alors qu'après

broyage, du fait de la mise en contact des substrats et des enzymes, les réactions pouvaient avoir lieu. Ce phénomène caractérise certains mutants dits « cryptiques » : un organisme cryptique vis-à-vis d'un substrat donné possède tous les enzymes pour métaboliser et dégrader ce substrat mais il n'y a pas, dans ce cas, mise en contact du substrat et des enzymes.

Étant donné l'extraordinaire développement actuel des recherches dans ce domaine, on ne peut aborder tous les aspects de la question. Nous espérons seulement dans cette mise au point, préciser un certain nombre de résultats relatifs à la perméabilité des levures aux sucres et aux acides aminés. Ce choix peut être justifié non seulement à cause du grand nombre de travaux fondamentaux qui ont été menés à bien sur ces germes mais encore grâce à l'importance économique et technologique de la production et de l'utilisation des levures.

I. — STRUCTURES D'ÉCHANGE

1. *La paroi*

En allant de l'extérieur vers l'intérieur, la première barrière que l'on rencontre est constituée par la paroi cellulaire. Il faut à ce sujet proscrire le terme de membrane cellulaire ; l'appellation *cell-wall* des Anglo-Saxons est beaucoup plus explicite. La paroi de la levure est en effet une véritable coque dure et solide qui permettrait à la cellule de résister à des traitements violents et la rend quasi-insensible au choc osmotique. D'après les remarquables photographies faites au microscope électrosique par Moor et Muhlethaler (1963) et Streiblova (1968), il semble que la structure de cette enveloppe est fibrillaire et qu'il y a de nombreux points de liaison intime avec la membrane cytoplasmique. L'absence de plasmolyse des cellules de levure tend à confirmer ces observations. Streiblova (1968) a obtenu, par la technique de *Freeze etching*, des vues où l'on peut remarquer, sur des protoplastes de levures, une couche provenant de la partie interne de la paroi qui adhère à la membrane. Alper et *al.* (1967) avaient déjà signalé ces adhérences sur des levures traitées à la ribonucléase. Les invaginations de la paroi interne remarquées par Moor et Muhlethaler (1963), Ottolenghi (1966) et Streiblova (1968) correspondraient d'après Bacon et *al.* (1966), aux endroits où presque toute la chitine de la levure est accumulée.

Le problème de la perméabilité de la paroi qui constitue la première barrière physique entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule se pose en principe. Pratiquement, la paroi ne semble avoir aucun rôle direct dans la pénétration des sucres et des acides aminés ; elle peut être considérée comme un crible à mailles larges. Cependant Schlenk et Dainko (1966) ont montré que la ribonucléase ne peut pénétrer dans les cellules entières tandis que les protoplastes sont partiellement perméables à cet enzyme. De même, la paroi cellulaire peut jouer un rôle indirect ; on sait (Sutton et Lampen, 1962) qu'une grande partie de la β-fructosidase s'accumule au voisinage immédiat de la paroi. Ainsi les protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae* ne fermentent pas le saccharose. A ce sujet Burger et *al.* (1961, *a*) ont montré que la β-fructofuranosidase se trouve dans l'espace ménagé entre la membrane et la paroi. On sait éga-

lement que la mélibiase est associée à la paroi (Friis et Ottolenghi, 1959) et que les protoplastes de levures sécrètent des phosphatases acides (Mac Lellan et Lampen, 1963). Rappelons que Conway et *al.* (1949) ont estimé le *cell wall space* à 12 p. 100 du volume cellulaire.

2. *La membrane cytoplasmique*

Dans une mise au point récente M. Grenson (1967) écrit :

« La membrane doit donc posséder des caractéristiques tout à fait exceptionnelles qui en font un véritable organe de la cellule », et plus loin :

« On est conduit à penser que la membrane n'est pas un sac passif à travers lequel les molécules diffusent en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de celles de la membrane. Il faut admettre que la membrane est, en principe, imperméable et que certains de ses constituants fonctionnent activement pour prélever des substances du milieu, après les avoir choisies. Les systèmes doivent ensuite faire entrer les substrats dans la cellule et éventuellement, les y concentrer, les empêchant de ressortir, contre un gradient de potentiel chimique, en consommant de l'énergie. »

C'est véritablement à la lumière de cette conception du rôle de la membrane qui correspond presque parfaitement avec les faits expérimentaux dégagés ces dernières années, qu'il faut examiner les anciennes données concernant la perméabilité cellulaire.

Les premières indications sur la pénétration des ions dans les cellules végétales sont certainement dues à Overton (1895) qui a pressenti la nature lipido-protéique de la membrane. Les travaux de Collander (1937) ont montré, sur les cellules internodales de *Chara*, que la pénétration des substances organiques est, dans une large mesure, fonction de leur solubilité dans les solvants apolaires.

Ainsi, on a pensé très rapidement à la nature lipidique de la membrane car :

— il y a corrélation étroite entre la solubilité dans les lipides et la faculté pour une substance de pénétrer à l'intérieur de la cellule ;
— on a mesuré la résistance électrique des membranes ; c'est la même (100 000 Ω/cm^2) que celle d'une couche bimoléculaire de lipides de 50 Å d'épaisseur ;
— il y a coalescence des huiles et des corps gras avec la membrane ;
— les agents lipolytiques (benzène, tétrachlorure de carbone, digitonine, savon, etc.) provoquent une lyse de la membrane ; il en est de même pour certains enzymes lipolytiques.

Cependant la membrane cytoplasmique ne peut être uniquement lipidique pour les raisons suivantes :

— la membrane possède une élasticité et une résistance mécanique incompatibles avec une structure purement lipidique ; en effet, on peut l'étirer au micro-manipulateur ;
— la tension superficielle entre la membrane et le milieu extracellulaire présente une valeur beaucoup plus faible que celle qu'on obtiendrait avec, uniquement, les lipides ; par contre, des mélanges lipido-protéiques de synthèse satisfont aux observations effectuées *in vivo* ;

— les propriétés antigéniques des surfaces cellulaires ne peuvent être le fait de composés lipidiques. En revanche, les substances protéiques possèdent de telles propriétés ; notons cependant que chez la levure, elles sont beaucoup plus faibles que chez les bactéries.

L'agencement lipido-protéique classique fut proposé par DANIELLI (1943), confirmé après observation au microscope électronique par ROBERTSON (1959) et vérifié au moyen de la technique de diffraction aux rayons X par FINEAU (1961). Deux couches protéiques, foncées au microscope électronique, entourent deux couches claires de phospholipides ; les groupes polaires des phospholipides sont liés par des liaisons hydrogène au CO et au NH des chaînes protéiques. Les radicaux des acides gras se font face et peuvent entourer des molécules d'ergostérol qui sont cependant assez peu nombreuses chez la levure et toujours sous forme estérifiée (DUPUY, MAUGENET et MORFAUX, 1966). La généralité de cette structure paraît acquise pour les nombreuses organisations intracellulaires telles que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les membranes nucléaires, mitochondriales et vacuolaires. Très récemment, il est apparu que cette structure en « sandwich » ne rend compte que d'une partie de la vérité et n'est certainement pas continue. Il y a dans la membrane des inclusions et des invaginations (MOOR et MUHLETHALER, 1963) dont il reste à préciser le rôle. De plus, il faut bien se rendre compte qu'un petit nombre de levures seulement ont été étudiées.

II. — MÉCANISMES D'ÉCHANGE

Pour qu'il y ait passage d'une molécule à travers la membrane cytoplasmique, il faut qu'il existe une force tendant à faire déplacer cette molécule et que la traversée de la barrière soit possible.

Dans le cas des échanges de susbtances organiques, principalement sucres et acides aminés, nous allons rappeler brièvement les principaux processus de transport qui ont été mis en évidence :

1. *Transport passif*

— La simple diffusion est exprimée par la loi de Fick : la vitesse d'échange dépend de la surface de contact, de l'épaisseur à traverser et de la différence de concentration. L'énergie utilisée est produite par l'agitation thermique du milieu et ne provient pas du métabolisme. L'accumulation ne se fait pas contre le gradient de concentration.

L'observation de cinétiques d'entrée ou de sortie linéaires a souvent conduit à penser que des molécules, autres que l'eau, traversent la membrane par diffusion libre. Cependant, comme le fait remarquer GRENSON (1967) en analysant les travaux de CONWAY (1954), KEPES (1960), HOREKER, THOMAS et MONOD (1960), il semble que les expériences effectuées impliquent une combinaison des molécules avec les éléments

de la membrane. L'hypothèsede KEPES (1960) qui pense que la sortie des galactosides s'effectue par un processus de « diffusion facilitée », c'est-à-dire, à l'état complexe, avec un transporteur qui rend franchissable la barrière de diffusion, paraît être vérifiée aujourd'hui. On ne voit pas en effet de raison plausible pour que la barrière de perméabilité modifie ses caractéristiques physiques.

— La « diffusion facilitée ». Elle a été définie par DANIELLI (1954) et ne fait pas intervenir l'énergie métabolique. L'accumulation ne se fait pas contre le gradient de concentration. La cinétique est du type « Michaelis-Menten ». Ainsi la vitesse maximum d'échange est très rapidement atteinte, dès que le système est saturé. Cette cinétique implique la combinaison avec un transporteur (KEPES, 1960). Il y a inhibition compétitive possible entre deux substrats et sensibilité à certains inhibiteurs spécifiques (ions uranyl UO_2^{++}). La réaction est très affectée par la température ($Q_{10} > 2$).

2. *Transport actif*

— Le mouvement de nombreux solutés importants au point de vue physiologique ne peut être expliqué par le transport passif ; il requiert en effet la production d'énergie métabolique. Ce transport admet une vitesse maximum qui est très vite atteinte quand la concentration augmente (cinétique de Michaelis-Menten) et il est sensible aux inhibiteurs généraux du métabolisme, principalement aux inhibiteurs des phosphorylations oxydatives. L'accumulation de substance peut se faire contre le gradient de concentration. A l'équilibre (*Steady State*, KEPES, 1960), il y a égalité entre la sortie et l'entrée des molécules.

On peut remarquer immédiatement que la diffusion facilitée est difficile à distinguer du transport actif surtout si le substrat est métabolisable. Certains auteurs comme WIDDAS (1954) pensent que le transport actif est en en réalité un phénomène de diffusion facilitée suivi d'une utilisation ou d'une accumulation qui dépend de l'énergie fournie par le métabolisme.

3. *Quelques méthodes d'étude*

Nous ne pouvons passer en revue toutes les méthodes qui ont été successivement employées pour déceler et mesurer la pénétration et la sortie de molécules dans les cellules. L'emploi des marqueurs isotopiques est actuellement général et a décuplé les possibilités d'investigation. Cependant CONWAY et *al.* (1949) suivaient la pénétration de substances non métabolisables chez la levure en mesurant à intervalles réguliers leur disparition dans le surnageant. Cette méthode présente deux inconvénients principaux :

— il faut une grande quantité de cellules,

— la précision est faible car il est difficile de mesurer exactement l'infime quantité de produit qui pénètre dans les cellules.

Dans le cas des éléments radioactifs, BRITT et *al.* (1958) font remarquer qu'il peut y avoir fixation du produit utilisé sur la paroi. Il faut donc à 0°C mesurer la rétention mécanique des cellules et des membranes millipores qui ont servi à récupérer les germes pour analyser leur contenu. A cet égard, l'utilisation de protoplastes de levures

(CIRILLO, 1962 *b*) permet de supprimer cette manipulation. Enfin, la technique de filtration rapide sur membrane (BRITTEN et *al.*, 1955) autorise des mesures de la vitesse initiale d'échange et de la concentration interne dans les cellules (KEPES et *al.*, 1962).

III. — PERMÉABILITÉ AUX SUCRES

Il apparaît immédiatement que les phénomènes d'hydrolyse, de phosphorylation et de transport des sucres sont intimement liés. Il en résulte une très grande complexité dans l'interprétation des résultats et des difficultés quelquefois insurmontables pour faire la part respective des différents processus.

La membrane des levures est généralement imperméable à la libre diffusion des glucides (CONWAY et *al.*, 1949). Cela s'explique comme pour toutes les membranes cellulaires par la taille des molécules et par leur insolubilité dans les lipides.

1. *Hydrolyse et phosphorylation*

Il semble maintenant acquis que les β-fructosides (saccharose, raffinose etc.) comme les α-galactosides (mélibiose) sont hydrolysés avant de pénétrer dans les cellules. Les enzymes responsables de l'hydrolyse se trouvent à l'extérieur de la membrane, vraisemblablement liés aux structures de la paroi. Ainsi FRIIS et OTTOLENGHI (1959) ont montré que la mélibiase est liée à la paroi puisque les protoplastes de levures ne peuvent dégrader le mélibiose. De même, BURGER et *al.* (1961 *a*) d'une part, SUTTON et LAMPEN (1962) d'autre part, ont remarqué que ces protoplastes sont incapables de fermenter le saccharose. Les hexoses produits par l'hydrolyse peuvent être piégés avant leur entrée dans la cellule par l'hexokinase + ATP (1). L'hydrolyse extérieure est donc l'étape précédant la pénétratrion des hexoses libérés. On peut alors expliquer les résultats de DAVIES (1956) qui a montré chez *Saccharomyces fragilis* que la production de β-fructosidase adaptative accompagne la faculté d'assimiler le saccharose et le raffinose.

Pour les autres sucres, il y a une étape membranaire avant leur catabolisme ou leur anabolisme. En effet, les sites de pénétration peuvent être communs pour certains sucres métabolisables et non métabolisables ; leur cinétique d'entrée peut être la même mais les sucres non métabolisables ne peuvent être phosphorylés par l'hexokinase. De plus, comme nous le verrons par la suite, il est possible de retrouver les glucides, à l'état libre, à l'intérieur des cellules. En effet, l'hexokinase qui fonctionne avec le cation Mg^{++} est inhibée compétitivement par le Ca^{++} lequel peut également déplacer les ions uranyl fixés et favoriser ainsi la pénétration des sucres qui se retrouveront à l'état libre à l'intérieur de la cellule. Ainsi on connaît des mutants de *Saccharomyces* ne possédant pas de galactokinase et accumulant le galactose (ROBICHON-SZULMAJSTER, 1961). ROTHSTEIN et *al.* (1965) signalent que, si la pénétration des sucres peut être inhibée par les ions uranyl (UO_2^{++}) qui se lient aux groupes phosphoryles et carbonyles de la membrane, par contre, le métabolisme des substances qui se trouvent à l'intérieur des cellules n'est pas affecté, notamment la glycolyse.

(1) ATP : Adénosine tri-phosphate.

2. *La perméabilité aux α-glucosides*

Depuis la publication de ROBERTSON et *al.* (1957), on a la certitude que les cellules de *S. cerevisiae* possèdent un système perméasique pour les α-glucosides. L'analyse de l'α-glucoside « perméase » a montré que ce transport devait être qualifié de transport actif, puisqu'il était dépendant de l'énergie métabolique et sensible au DNP (1). La cinétique est du type Michaelis-Menten, et la constante apparente est de 0,12 M pour l'α-MG (2). L'accumulation de l'α-MG est inhibée de façon compétitive par le maltose. Au cours de la désadaptation, les cellules peuvent devenir momentanément imperméables au maltose. Le fait que l'on ne trouve pas de maltose à l'état libre dans les cellules adaptées laisse supposer que l'étape de pénétration est le facteur limitant au cours de la dégradation.

Les résultats de DE LA FUENTE et *al.* (1962) ont confirmé les précédents, en apportant d'autres arguments pour l'existence d'un mécanisme de perméabilité spécifique du maltose et des α-glucosides avant leur hydrolyse intra-cellulaire.

Le maltose et le turanose ne sont pas hydrolysés avant de pénétrer à l'intérieur des cellules puisqu'on ne retrouve pas de glucose à l'état libre dans le milieu, et que le système piège : hexokinase + ATP, n'a aucune influence sur leur fermentation. Le pH optimum de fermentation (pH 3,5) ne correspond pas au pH optimum des enzymes d'hydrolyse qui est pH 7 à 7,8. Enfin les affinités des cellules entières pour le maltose et le turanose sont l'inverse des affinités mesurées *in vitro* sur des préparations *cell-free*.

Les travaux de LINDEGREEN (1957) ont montré que les gènes MA, MG, SU et MZ contrôlent la synthèse inductible des enzymes d'hydrolyse du maltose, de l'α-MG, du saccharose et du mélécitose. En utilisant des haploïdes de *S. cerevisiae*, AVIGARD (1960) a observé que la souche de génotype MA, *mg*, *su*, *mz*, poussant sur glucose est imperméable au maltose et à l'α-MG, mais possède un système de transport constitutif pour le saccharose. Lorsque ces cellules poussent sur maltose on a induction simultanée du transport du maltose et de la maltase. Dans les souches MA, MG, *su*, *mz* en croissance sur maltose, on assiste à l'induction simultanée du système de transport et des glucosidases correspondantes au maltose et à l'α-MG. En revanche, ces mêmes cellules poussant sur α-MG sont imperméables au maltose. L'existence d'un système enzymatique de perméabilité est donc prouvée pour le maltose. Un certain nombre de faits expérimentaux semblent indiquer que ce système peut avoir une spécificité assez grande. En effet, SPIEGELMAN (1954) signale que l'α-MG n'est pas un inhibiteur compétitif pour la pénétration du maltose. De même HAWTHORNE (1958) a isolé un mutant fermentant le maltose et imperméable à l'α-TEG (3). HARRIS et *al.* (1961) ont mis en évidence sur une autre souche qu'à pH = 8,5 le maltose est concentré 15 fois lorsque les cellules ont poussé sur maltose; quand les cellules ont poussé sur α-MG on n'observe pas de concentration. L'α-MG qui entre en compétition avec la pénétration du maltose n'a aucun effet sur l'échange du maltose interne. Enfin OKADA et HALVORSON (1964) ont montré que chez la souche mg_2 le système de transport du maltose peut être induit sans qu'il y ait induction du système d'accumulation de l'α-TEG analogue de l'α-MG.

(1) DNP : dinitro-phénol
(2) α-MG : α-méthyl-glucoside
(3) α TEG : α-thio-éthyl-galactoside

Si, chez *S. fragilis* il existe un système de transport spécifique pour l'α-MG différent du système de transport du maltose (BURGER et *al.*, 1959), cela ne semble pas être le cas de *S. cerevisiae* (OKADA et HALVORSON, 1963 *a*, *b*, 1964 *a* et *b*). Outre le système constitutif de perméation pour le saccharose, les systèmes inductibles pour l'α-MG et le maltose, HARRIS et *al.* (1960) ont montré l'existence d'un système inductible de perméation pour le maltotriose.

A notre connaissance, c'est le système de transport de l'α-TEG qui est le mieux connu. OKADA et *al.* (1964 *a*, *b*) ont étudié le contrôle génétique du transport de cet analogue de l'α-MG. L'α-TEG peut pénétrer dans les cellules de *S. cerevisiae* par deux mécanismes, une diffusion facilitée constitutive et un transport actif inductible, tous deux contrôlés par le gène MG_2.

Les caractéristiques de la pénétration par diffusion facilitée ont pu être observées lorsque les cellules ont poussé en présence de glucose. Le glucose, comme pour la β-galactoside perméase d'*E. coli* paraît être un inhibiteur de l'induction (COHEN, 1967). De même en présence d'une concentration de 0,1 M d'acétate, l'induction est inhibée. La concentration interne d'α-TEG, qui est réparti dans le volume accessible à l'eau cellulaire, ne dépasse jamais la concentration externe ; l'α-TEG n'est donc pas transporté contre le gradient de concentration. La constante apparente de Michaelis-Menten mesurée en portant la vitesse initiale de la pénétration en fonction de la concentration externe est de $50 \cdot 10^{-3}$ M. Enfin, les inhibiteurs, 2-4 DNP et azide de sodium, sont sans action. Il semble donc que la pénétration soit indépendante de l'énergie métabolique. Le système est constitutif puisque les analogues structuraux des acides aminés sont sans action sur la constitution éventuelle d'une nouvelle protéine induite.

Chez les cellules induites par l'α-MG, l'accumulation de l'α-TEG est 100 fois supérieure à celle des non-induites. Cette induction n'est effective que dans les conditions qui permettent la synthèse protéique ; en présence de 10^{-2} M de *p*-fluorophénylalanine la croissance et l'induction sont inhibées de 71 p. 100 et 66 p. 100 respectivement. L'activité perméasique augmente linéairement avec la masse des levures, ce qui est un autre caractère d'un enzyme inductible (COHEN et *al.*, 1957). Ceci laisse supposer qu'il s'agit bien de l'induction d'une perméase c'est à-dire une protéine spécialisée et spécifique. Si, chez la souche mg_2, le transport du maltose peut être induit sans qu'il y ait induction du système d'accumulation de l'α-TEG, par contre chez les souches MG_2, le mélibiose, le galactose, le tréhalose, le saccharose, le maltose, le cellobiose, l'α-TEG et l'α-MEG induisent en même temps le système d'accumulation du maltose et de l'α-TEG.

L'accumulation de l'α-TEG se fait par un transport actif puisqu'on observe une inhibition par l'azide de sodium. La pénétration est linéaire pendant 30 minutes et atteint un palier au bout de 45 à 50 minutes. La constante enzymatique apparente est de $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ M calculée à partir de la vitesse initiale et de $3 \cdot 10^{-3}$ M calculée à partir de l'état d'équilibre.

Le fait que le transport actif et la diffusion facilitée soient contrôlés par le gène MG_2 semble indiquer que le transport actif peut dans ce cas être considéré comme un processus en deux étapes (CIRILLO, 1961). L'hypothèse émise est que la protéine induite pourrait avoir le rôle de coupler les deux phénomènes. L'α-MG paraît utiliser le même système de transport que son analogue, l'α-TEG, car le pH optimum de son

utilisation est identique au pH optimum du système de perméation. Cependant le K_i est égal à $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ M alors que le K_m de fermentation est de $2{,}3 \cdot 10^{-3}$ M. Ceci montre que le transport constitue l'étape limitante du métabolisme. L'α-TEG peut être déplacé par le maltose, l'α-MG, le glucose qui sont les inhibiteurs compétitifs de son accumulation ; les β-glucosides et les galactosides sont sans action.

En ce qui concerne la sortie éventuelle de ces sucres (exsorption), la constante k de l'équation :

$$\text{Log } (C_o - C_t) = k_t$$

où C_o et C_t sont les concentrations intracellulaires au temps initial et au temps t est toujours la même :

0,18 h^{-1} pour les souches induites,
0,21 h^{-1} pour les souches non induites

Le système de sortie est donc constitutif à la différence de la galactose perméase d'*E. coli* (HORECKER, 1960).

3. *Perméabilité aux β-galactosides*

A l'heure actuelle, il n'y a pas eu d'études permettant de caractériser la nature du système perméasique du lactose et des β-galactosides chez les espèces de levures capables de fermenter le lactose. CONWAY et *al.* (1949), BURGER et *al.* (1959) ont montré que *S. cerevisiae* qui ne fermente pas le lactose est imperméable à ce sucre. DE LA FUENTE (1962) suggère que l'existence d'un transporteur stéréospécifique est indispensable pour permettre l'utilisation des β-galactosides par les cellules de *S. fragilis*. En effet, le fait que le lactose peut être fermenté à une vitesse plus grande que la vitesse d'utilisation de ses propres constituants exclut la possibilité d'une hydrolyse avant de pénétrer dans les cellules. De plus, dans les cellules ayant poussé sur lactose, on peut mettre en évidence une activité enzymatique 10 fois supérieure à la réaction effectivement observée ; le pH optimum de fermentation (pH = 3,5) ne correspond pas au pH optimum des hydrolases.

4. *Perméabilité aux β-fructosides et α-galactosides*

Les β-fructosides comme les α-galactosides ne pénètrent pas directement dans les cellules de levure avant d'être hydrolysés. De nombreuses indications viennent appuyer cette affirmation, comme nous l'avons déjà vu. Le problème se ramène donc à l'étude du transport des mono-saccharides.

5. *Transport des mono-saccharides*

Il a été largement travaillé au cours de ces dernières années, soit en utilisant des sucres non métabolisables, soit en inhibant le métabolisme par l'iodoacétate pour les sucres métabolisables. La perméabilité au galactose est certainement la mieux connue grâce à l'utilisation des souches dont les enzymes de dégradation du galactose et les perméases sont sous la dépendance de gènes différents.

De nombreux auteurs : BURGER et *al.* (1959), CIRILLO (1961, 1962, 1963) et KOTYK (1962) ont prouvé que le transport des mono-saccharides présente chez *S. cere-*

visiae les caractéristiques d'une diffusion facilitée. CIRILLO (1962) a notamment démontré que le transport du sorbose et du fucose se produit indépendamment de l'énergie métabolique, puisque ce transport continue à être effectif sous atmosphère d'azote et en présence de 10^{-3} M d'iodoacétate. Dans ces conditions le métabolisme du phosphate mesuré en présence de glucose est complètement bloqué. De plus, la participation des phosphates paraît être exclue puisque le sorbose accumulé dans les cellules représente dix fois la somme des phosphates totaux des cellules.

Il semble (VAN STERVENINCK et *al.*, 1965), que le transport par diffusion facilitée ne fasse pas intervenir les groupes phosphoryles mais plutôt les groupes carbonyles de la membrane. En effet, la diffusion facilitée n'est pas affectée par les ions Ni^{++} qui se lient aux polyphosphates et est inhibée par les ions UO_2^{++} se liant aux carbonyles. De plus les ions Ni^{++} ne sont pas déplacés par le L-sorbose et le galactose dans les cellules non induites. Le fait que les sucres, tel que le L-sorbose (CIRILLO, 1962 *b*), restent sous forme osmotiquement active dans les protoplastes indique qu'ils ne sont pas liés à des sites intracellulaires.

KOTYK et *al.* (1963) ont d'autre part observé que le volume directement accessible au D-xylose représentait vraisemblablement le volume directement accessible à l'eau libre. Ce volume est pratiquement identique au volume cellulaire accessible à l'urée. Dans les cellules non proliférantes, il est beaucoup plus important que dans les cellules en croissance. Enfin l'espace directement accessible au D-xylose n'est pas affecté par le 2,4-DNP, l'iodoacétate, le cyanure de potassium et l'oligomycine.

D'après CIRILLO (1968), le système de transport des monosaccharides présente une large spécificité pour les pyranoses. En effet, le D-glucose est la forme qui présente la plus forte activité d'inhibition pour le L-sorbose et tout changement dans chacun des cinq carbones du D-glucose entraîne une diminution d'activité (exception : le 2-déoxyglucose). La perte maximum d'activité est obtenue par méthylation ou glucosylation de l'hydroxyle anomérique. KOTYK (1967 *a*, *b*) a mis en évidence une distribution cellulaire variable pour les divers sucres. En conséquence, il faut à l'heure actuelle, postuler l'existence de systèmes de diffusion facilitée différents entre eux.

Ces auteurs sont cependant d'accord pour penser que le D-xylose, D-arabinose, D-lyxose, L-glucose, L-sorbose et les sucres métabolisables D-glucose, D-fructose, D-mannose, utilisent le même transporteur chez *S. cerevisiae*. En effet, il existe dans ce cas une inhibition de type compétitif entre ces sucres et des réactions d'échange qui ne peuvent être expliquées que par un transporteur commun. (CIRILLO, 1962 ; SCHARFF, 1962 ; WILKINS et *al.*, 1965 ; WILKINS, 1967 ; KOTYK, 1965, 1967 *a*, *b*, *c*).

Toutefois il y a des différences entre les levures : ainsi chez *Rhodotorula gracilis*, KOTYK et *al.* (1965) ont montré que les sucres métabolisables et non métabolisables tels que le D-xylose, le D-arabinose, le L-rhamnose, le D-glucose peuvent être transportés activement contre un gradient de concentration. Chez les levures psychrophiles (CIRILLO, 1963), le Q_{10} pour le transport du sorbose est de 5 alors qu'il est de 1,7 pour les non psychrophiles.

Selon VAN STERVENINCK (1965) le glucose doit pénétrer par un mécanisme de transport actif chez *S. cerevisiae* ainsi que le fructose et le mannose qui utilisent le même système (SCHARFF et *al.*, 1962). En effet, la pénétration du glucose est inhibée par le Ni^{++} et son K_m apparent de $5{,}3 \cdot 10^{-3}$ M est de l'ordre de grandeur des affinités des transports actifs.

Pour le galactose, le transport actif a pu être démontré clairement grâce aux travaux de ROBICHON-SZULMAJSTER (1961) ; le transport du galactose est sous la dépendance d'un gène G_2 et il peut être induit séparément de la galactokinase. Récemment, VAN STERVENINCK et *al.* (1968) ont précisé, chez *S. cerevisiae* HANSEN CBS 1172 que l'induction changeait la diffusion facilitée du galactose en un transport actif. La constante d'affinité qui est de 0,653 M pour les cellules non induites passe à $4{,}9 \cdot 10^{-3}$ M pour les induites. De même la spécificité du transport pour le galactose est augmentée : en effet, l'affinité glucose/galactose qui est de 100/1 dans le cas général, est de 1/1 dans les cellules induites (ROBICHON-SZULMAJSTER, 1961). Le L-sorbose qui pénètre par un mécanisme de diffusion facilitée est déplacé par le galactose utilisant le transport actif. Cela permet de supposer que le transporteur pourrait être le même pour ces deux sucres. En outre, on peut observer, en étudiant la vitesse de pénétration du galactose en fonction du pH, après induction, une courbe à deux maxima. Ce fait intéressant qui a été également remarqué par ROTHSTEIN (1961) pour l'oxydation du glucose, reste encore inexpliqué.

Enfin l'induction rend la pénétration du galactose sensible aux ions Ni^{++}, ce qui permet de penser à l'utilisation des groupes phosphatidiques membranaires pour le transport actif.

Les études de DEIERKAUF et *al.* (1968) confirment ces résultats. Ils ont montré sur la souche haploïde de *S. cerevisiae* de génotype *gl*G_2 induite, la conversion du phosphatidylglycérophosphate en phosphatidylglycérol au cours du transport actif. Les polyphosphates servent vraisemblablement de donneurs pour la conversion et cette transformation n'a pas lieu sur la souche non induite.

Ainsi tous les aspects du rôle physiologique du système de perméation des sucres chez les levures sont loin d'être très bien connus. Cependant un résultat important, dégagé des développements précédents, mérite toute notre attention :

— la perméabilité aux divers substrats est souvent le facteur limitant des réactions du métabolisme. On peut maintenant expliquer par la compétition du glucose et du galactose pour la galactose perméase (ROBICHON-SZULMAJSTER, 1961) l'utilisation préférentielle d'un sucre. De même chez le mutant à déficience respiratoire, le sorbose inhibe la croissance (VAN UDEN, 1967). Il faut relier ces résultats à ceux de KOTYK et *al.* (1967 *a*) qui ont trouvé que la constante d'affinité du glucose est beaucoup plus élevée en aérobiose ($17{,}4 \cdot 10^{-3}$ M) qu'en anaérobiose ($6{,}7 \cdot 10^{-3}$ M) ou en présence de 2,4 DNP ($5{,}6 \cdot 10^{-3}$ M). Ces mesures confirment celles faites par SCHARFF (1962). Cet effet est peut-être dû à la présence du glucose-6 phosphate dont la concentration est beaucoup plus élevée en aérobiose qu'en anaérobiose. SOLS et *al.* (1963) avaient déjà mis en évidence le rôle important que pouvait jouer le glucose-6 phosphate dans le mécanisme de l'effet Pasteur outre l'action de l'ATP et du citrate sur l'activité de la phospho-fructokinase (SALAS et *al.*, 1965).

Les difficultés rencontrées au cours de l'interprétation des phénomènes observés viennent de ce que nos connaissances sur la structure chimique de la membrane ne sont que partielles si bien que les mécanismes de transport au niveau moléculaire restent pour la plupart spéculatifs. A la différence des systèmes métaboliques qui peuvent être étudiés par des réactions *in vitro* avec les enzymes responsables, les processus de transport ne peuvent avoir lieu que dans un système intégré, les membranes étant de toutes façons intactes.

IV. — PERMÉABILITÉ AUX ACIDES AMINÉS

Depuis les travaux d'HALVORSON (1965), on sait qu'il existe un système de transport actif pour les acides aminés chez les levures : la vitesse d'accumulation de l'arginine, de la lysine et de l'acide aspartique suit un isotherme de Henri Michaelis. L'accumulation exige une source d'énergie utilisable et est inhibée par le 2,4-DNP et l'azide de sodium (SURDIN et *al.*, 1965). Il apparaît que le système d'accumulation est beaucoup moins spécifique que ceux décrits chez *E. coli* (COHEN et RICKENBERG, 1958). Par exemple, l'isoleucine, la méthionine et la phénylalanine inhibent la pénétration de la valine, alors que la proline ne l'inhibe pas. HALVORSON et COHEN (1958) concluent que la spécificité réside dans le groupe aminé. SURDIN et *al.* (1964 et 1965) ont confirmé ces résultats sur une souche haploïde de *S. cerevisiae* : il existe un facteur monogénique faisant varier la capacité de concentrer les acides aminés de 100 fois à 10 fois.

Contrairement à SURDIN et *al.* (1965) et SORSOLI et *al.* (1964), GRENSON et *al.* (1967) isolèrent des mutants qui ne sont pas affectés en même temps dans le transport de tous les acides aminés. Sur une souche *S. cerevisiae* haploïde, ils ont mis en évidence un système perméasique de la L-arginine avec un $K_m = 10^{-5}$ M et une $V_{max} = 23 \cdot 10^{-3}$ µmole/mg de protéine/minute. La L-canavanine, L-lysine, L-ornithine et D-arginine exercent une inhibition compétitive et la L-histidine une inhibition mixte. Il existe également (GRENSON, 1966) (GITS et *al.*, 1967) deux systèmes perméasiques distincts pour la L-lysine et la L-méthionine. Les deux constantes d'affinité pour les deux systèmes permettant le transport de la lysine sont égales à $2 \cdot 10^{-4}$ M et $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ M. Donc, le système ayant la plus grande affinité pour la lysine semble ne devoir transporter qu'elle seule, alors que l'autre système est commun à la lysine et à l'arginine. De même GITS et *al.* (1967) ont mesuré deux constantes d'affinité pour la L-méthionine qui sont respectivement $K_m = 1{,}2 \cdot 10^{-5}$ M et $K_m = 7{,}7 \cdot 10^{-5}$ M. HALPERN et *al.* (1965) ont effectué des mesures semblables pour le L-glutamate. Il paraît donc certain qu'il y a chez la levure comme chez *E. coli* pour l'histidine (FERROLUZZI-AMES, 1964) plusieurs systèmes perméasiques pour un acide aminé. Notons que chez *Neurospora crassa* BAUERLE et *al.* (1964) et avec des bactéries SCHWARTZ et *al.* (1959), ont mis en évidence des interactions de ce type.

Il faut préciser toutefois (MAW, 1963-1965) que l'accumulation des acides aminés soufrés chez la levure revêt une étroite spécificité.

Si, comme nous venons de le voir, les loci met. pl, arg. pl et lys. pl sont indépendants, le problème de l'expression des génotypes en fonction du milieu n'est pas résolu (GITS et *al.*, 1967). Les mutations sur les systèmes perméasiques ne s'expriment qu'en présence de l'ion NH_4^+ (GRENSON, 1967). De même DAVIS et ZIMMERMANN (1965) ont noté chez *Neurospora crassa* une expression de la mutation différente suivant le milieu de culture.

Il apparaît d'après les résultats que nous venons de résumer brièvement qu'il doit exister un mécanisme de régulation commun à l'entrée des acides aminés n'ayant aucune relation structurale entre eux. Ainsi, en utilisant deux analogues structuraux (GITS, 1967) signale qu'il a obtenu des mutants affectés dans le transport de tous les acides aminés.

On n'a pas encore isolé de système inductible d'accumulation d'acides aminés ; tous les systèmes connus sont constitutifs mais à cet égard la situation risque de changer puisque aucune étude dans cette voie n'a été jusqu'à maintenant entreprise, à notre connaissance.

V. — LES RÉSERVES INTERNES D'ACIDES AMINÉS « POOLS »

Les travaux de GALE (1947) et de TAYLOR (1947) ont montré que les organismes Gram-positifs contiennent de grandes quantités d'acides aminés aisément extractibles. En 1953, HALVORSON et SPIEGELMAN ont montré que ces « pools » d'acides aminés libres peuvent être utilisés chez *S. cerevisiae* pour la synthèse des enzymes induits. Puis COWIE et WALTON (1956) ont précisé l'état de ces acides aminés en étudiant le devenir du fructose uniformément marqué au C_{14} chez *Candida utilis* en croissance exponentielle sur milieu minéral. Par des mesures de cinétique d'incorporation des acides aminés formés dans les protéines, ils ont remarqué que le « pool » natif formé à partir du fructose est un intermédiaire direct dans la synthèse des protéines, en effet l'activité spécifique des acides aminés des protéines est la même que celle observée dans le « pool » natif qui fut encore appelé « pool » interne ou non expandable. Ce « pool » est différent du « pool » de concentration ou « pool expandable » que l'on peut observer lorsque les levures sont cultivées sur un milieu riche en ammonium ou en acides aminés (tabl. 1).

TABLEAU I

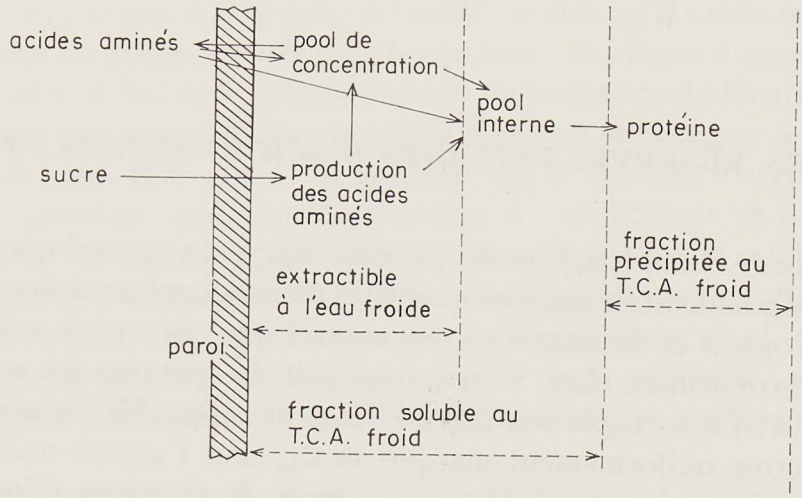
Principales caractéristiques des « pools » d'acides aminés chez Candida utilis, *d'après* COWIE *et al.* (1959)

Caractéristiques	Pool de concentration	Pool interne
Fonction	Concentre les acides aminés externes	Sélection et interconversion des acides aminés pour l'incorporation dans les protéines
Grandeur	Variable, dépend de la concentration extérieure	Constante
Stabilité	Sensible aux chocs osmotiques Échanges avec acides aminés externes	Insensible aux chocs osmotiques, pas échangeable.

KEMPNER et *al.* (1960) ont confirmé ces résultats en utilisant des analogues structuraux. A la différence d'*E. coli*, *Candida utilis* présente deux processus de sélection préférant les acides aminés plutôt que les analogues (tabl. 2). Dans le pool interne on retrouve notamment la même proportion d'analogues que dans les protéines. Au cours de la croissance exponentielle, le volume de ce pool interne est remarquablement constant et égal à 13 p. 100 du carbone (COWIE et *al.*, 1956).

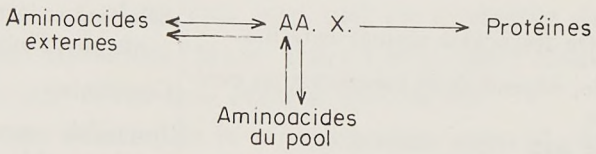
TABLEAU 2

Schéma synoptique de l'échange des acides aminés chez C. utilis, d'après KEMPNER et *al.* (1960) et HALVORSON et *al.* (1961)



Une question restée encore sans réponse à l'heure actuelle est l'état des acides aminés « fixés » dans le pool interne. L'insensibilité du pool interne aux pressions hydrostatiques peut être expliquée si l'on suppose que les acides aminés du pool interne sont liés à une structure cellulaire. COWIE et *al.* (1959) suggèrent que les acides aminés pourraient être liés à des protéines. Notons que BRITTEN et *al.* (1962) pensent que ce type de liaison pourrait chez *E. coli*, rendre compte des faits observés.

A côté du pool interne remarquablement constant, les levures possèdent un pool de concentration, ou pool expandable (COWIE et *al.*, 1959), formé par les acides aminés concentrés par la cellule. Ce pool est fonctionnellement et physiquement séparé du pool interne. A la différence du pool interne ce pool sensible à la pression osmotique est en équilibre avec les acides aminés externes. Ces acides aminés concentrés se mélangent avec les acides aminés produits par biosynthèse. Mais comme l'ont montré HALVORSON et COHEN (1958) chez *S. cerevisiae* avec la phénylalanine, les acides aminés externes peuvent être utilisés pour la synthèse des protéines sans équilibre avec le pool de concentration. C'est pourquoi ces auteurs ont proposé le schéma suivant :



La forme AA. X représente la fraction facilement réversible par addition d'un aminoacide. HALVORSON et COHEN (1958) ont observé, en effet, que l'addition d'un acide aminé ne déplace au maximum qu'une faible fraction de la phénylalanine radioactive préalablement accumulée. Ces échanges se stabilisent à un niveau (SURDIN et *al.*, 1965) qui varie avec l'acide aminé considéré : 80 p. 100 de la L-leucine accumulée est chassée par la L-méthionine alors que la L- ou la D-leucine n'en chassent que 50 p. 100. Il faut cependant noter que ces expériences ont été effectuées sur une souche haploïde de *S. cerevisiae* présentant une spécificité large pour l'accumulation des acides aminés. Dans ce cas les échanges hétérologues sont en faveur de l'utilisation

d'un réservoir unique pour les différents acides aminés, ce qui est confirmé par l'expérience suivante : si les cellules ont préalablement accumulé le L-aspartate jusqu'à une concentration de 0,01 M, la méthionine peut être accumulée jusqu'à la concentration interne de 0,01 M ; sans aspartate, elle peut atteindre la concentration de 0,037 M.

A notre avis, il serait intéressant d'étudier le « pool » de concentration chez une souche de *S. cerevisiae* ayant un système perméasique présentant une spécificité étroite pour un acide aminé.

VI. — SORTIE DES ACIDES AMINÉS

Les études de SURDIN et *al.* (1965) comme celles de COHEN et *al.* (1958) signalent qu'il n'y a aucune perte d'acides aminés à partir des levures, même par lavage prolongé. Pour qu'il y ait sortie il semble que la présence d'acides aminés exogènes soit nécessaire. Le fait que la valeur de l'équilibre dépende du nombre d'unités de perméation de la cellule indique que la réaction de sortie n'est pas catalysée par le même système que celui assurant l'accumulation. De plus, la réaction de sortie ne possède aucun caractère de spécificité, puisque les cinétiques d'échange sont identiques pour les formes D et L.

DELISLE et *al.* (1961) et LEWIS (1963) ont prouvé que la sortie est différente suivant la souche de levure étudiée et que cette sortie est augmentée trois fois lorsqu'on aère fortement les levures. Cependant comme SURDIN et *al.* (1965) ces auteurs notent que la réaction de sortie ne présente aucun caractère de spécificité. MORFAUX et DUPUY (1966) sont arrivés à la même conclusion ; ils ont obtenu un mutant résistant à la canavanine libérant de grandes quantités d'acides aminés de façon non préférentielle.

Sur *S. carlsbergensis* ayant poussé en culture non agitée (LEWIS et PHAFF, 1964), un sucre fermentescible peut entraîner une libération rapide d'une partie importante des acides aminés du pool suivie de réabsorption. Ce phénomène appelé *shock excretion* est variable avec la souche utilisée, il dépend de la température, de la nature et de la concentration du sucre fermentescible. Il ne dépend pas de l'énergie de la fermentation du sucre (LEWIS et *al.*, 1965), mais pour qu'il se produise il faut que le sucre pénètre dans les cellules. En présence d'ion UO_2^{++} on n'observe pas de *shock excretion*. Enfin, au cours du phénomène d'excrétion (LEWIS et *al.*, 1967), on n'observe pas la rentrée à l'intérieur des cellules des acides aminés radioactifs. Il apparaît en général que le glucose change la perméabilité de la membrane ; le sorbose est moins retenu lorsque les cellules ont été préexposées au glucose, mais l'effet du glucose est différent d'une souche à l'autre. Si l'on cultive les levures en culture agitée le phénomène de *shock excretion* n'est pas observé (MORFAUX, 1966). Les expériences que nous venons de résumer semblent donc indiquer que la réaction de sortie des acides aminés chez les levures n'est pas contrôlée par le même système que celui assurant l'accumulation. Le fait qu'au cours du phénomène de *shock excretion* on n'observe pas la rentrée des acides aminés peut vouloir dire que chez, les levures, dans certaines conditions, la présence d'un sucre fermentescible change le propriétés de la membrane et interfère avec la pénétration des acides aminés. PONCOVA et *al.*

(1967) ont montré que le glucose avait une influence sur l'équilibre des acides aminés concentrés. Il importerait de savoir si c'est davantage la réaction de sortie qui est affectée ou si c'est une diminution de la vitesse d'entrée. MUNCK (1968) a aussi souligné les interactions qui existaient entre le transport des sucres et des acides aminés dans l'intestin du Rat. Si, comme le pense DEIERKAUF (1968) l'hypothèse d'un transporteur commun pour les sucres et les acides aminés n'est pas très séduisante, il est fort possible que le glucose et les acides aminés interférent au niveau des polyphosphaphates puisque l'on observe la réaction phosphatidyl glycérophosphate → phosphatidyl glycérol au cours de la pénétration du tryptophane et de la glycine.

En considérant, d'une façon plus générale, le problème de la sortie des acides aminés des levures, il apparaît immédiatement que les informations que nous possédons sont extrêmement fragmentaires. Aucune étude systématique de l'excrétion des acides aminés n'a encore été publiée.

Du fait de l'importance de ce phénomène, tant en physiologie cellulaire qu'en microbiologie industrielle où il conditionne directement l'obtention de mutants de levures riches en certains acides aminés, il nous a paru très urgent d'entreprendre ce travail sur *S. cerevisiae*.

Les résultats seront donnés dans une publication ultérieure.

VII. — IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DES PERMÉASES D'ACIDES AMINÉS

SURDIN et *al.* (1965) pensent que l'efficacité du système de régulation par répression est en relation avec la concentration en co-répresseur atteinte dans le « pool » et que les effets de retard observés dans la dérépression de l'aspartokinase et de l'homosérine déshydrogénase peuvent s'expliquer par le maintien des acides aminés présents dans le pool ; leur sortie est en effet très lente.

WIAME et *al.* (1962) et BECHET et *al.* (1962) ont également montré que chez certains mutant résistants à la canavanine, l'ornithine transcarbamylase est insensible à la présence d'arginine externe. On sait maintenant qu'il ne s'agit pas de mutant déréprimé mais cela est observé parce que dans les levures il n'y a pas de co-répresseur à l'intérieur des cellules.

Sur une souche auxotrophe pour la lysine (SURDIN et *al.*, 1965), le taux de lysine nécessaire à la croissance passe de 1 µg/ml à 5,10 µg/ml lorsque la mutation affecte d'un facteur 10 la perméabilité à la lysine.

VIII. — DISCUSSION

Il se dégage de l'ensemble des résultats que nous venons d'examiner que l'accumulation spécifique des sucres et des acides aminés ne peut être due à l'adsorption sur des sites intracellulaires spécifiques selon l'hypothèse stœchiométrique (BRITTEN et *al.*, 1962). C'est pour un site accessible de l'extérieur qu'entrent en compétition les différents sucres et acides aminés, puisque c'est la concentration extracellulaire qui

régit la compétition. Cette accessibilité de l'extérieur impose à ces sites un rôle dans le transport du dehors au dedans.

Le comportement vis-à-vis des lois de l'osmose des sucres et des acides aminés intracellulaires ne permet de les supposer qu'à l'état libre dans les cellules ce qui a été confirmé maintes fois par chromatographie et par l'étude des protoplastes.

Cependant si l'hypothèse stœchiométrique paraît exclue, il apparaît à l'heure actuelle plausible de penser qu'il pourrait exister chez les levures des régions osmotiquement différentes ; par exemple, pour les acides aminés cette compartimentation pourrait expliquer la différence entre pools de concentration et pools internes. Cette hypothèse est d'autant plus probable que nous savons qu'il existe un réticulum endoplasmique particulièrement bien développé chez les levures (CIRILLO, 1961). Pour le moment il y a seulement des évidences indirectes pour la présence de régions osmotiques intracellulaires. Ainsi KOTYK (1967) a montré que tout le volume cellulaire n'est pas également accessible pour les différents sucres.

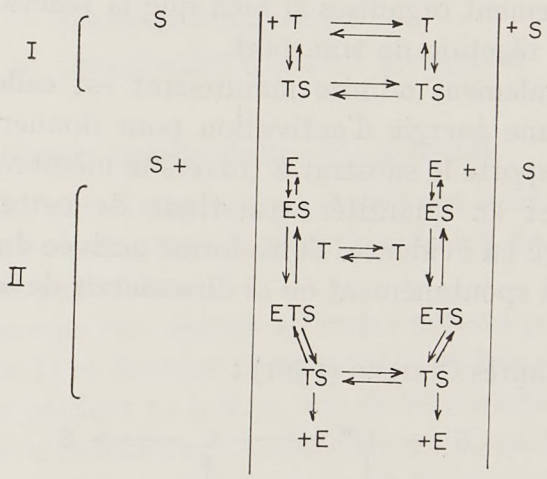
Le modèle de transport des sucres par diffusion facilitée doit rendre compte d'une cinétique de type Michaelis-Menten, de compétition entre les différents sucres et des trois faits suivants :

1. si un sucre est en équilibre de distribution et si un second sucre est ajouté d'un côté de la membrane, le mouvement de ce second sucre entraîne un mouvement du premier contre le gradient de concentration ;

2. si deux sucres ont une grande différence d'affinité pour le transport, le sucre qui a la plus faible affinité est transporté plus lentement aux faibles concentrations, mais plus rapidement aux fortes concentrations ;

3. si deux sucres ayant des affinités différentes pour le transport sont ajoutés ensemble, à une certaine concentration, on observe une inhibition, à une autre concentration on a une accélération.

Pour toutes les raisons que nous venons d'évoquer, le modèle de WILBRANDT et ROSENBERG (1961) dans lequel le complexe sucre-transporteur est assujetti à bouger à travers la membrane a permis de rendre compte d'un grand nombre de faits observés.



Dans les deux modèles que nous présentons, S représente la molécule de sucre, T le transporteur, E un enzyme. Le modèle II reflète le fait du caractère enzymatique des réactions de transport par diffusion facilitée, notamment la stéréospécificité.

Comme nous l'avons vu à propos de l'α-TEG, OKADA et *al.* (1964) et du galactose, (VAN STERVENINCK 1968), il apparaît chez les levures, comme pour le système de transport des β-galactosides d'*E. coli* (KEPES, 1960), qu'il faille considérer le transport actif comme un processus de diffusion facilitée et un processus d'accumulation dépendant de l'énergie. Le transport actif implique que le substrat intracellulaire soit le même que le substrat extracellulaire. Le résultat de ce transport est que le potentiel chimique du produit concentré est plus élevé que celui du produit extérieur. Ceci exige que le substrat concentré soit essentiellement un produit osmotiquement actif. L'énergie nécessaire peut être exprimée dans ce cas par la formule :

$\Delta F = RT \log \frac{G_{in}}{G_{ex}}$ par mole de G transporté de régions où l'activité est G_{in} à d'autres régions où l'activitê est G_{ex}. Par exemple pour un transport dont le rapport est :

$$\frac{G_{in}}{G_{ex}} = 400, \qquad \Delta F = 3\,600 \text{ cal/mole.}$$

Dans ce cas l'énergie d'une molécule d'ATP est largement suffisante. Ce rapport de 400 semble être le rapport maximum observé chez les levures.

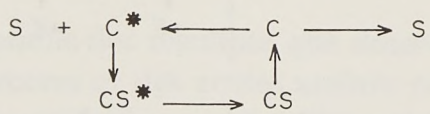
On ne peut pas retenir à l'heure actuelle, l'hypothèse de MITCHELL (1960) selon laquelle le transport des sucres est lié à la première étape de leur utilisation métabolique. De nombreux faits semblent exclure en effet cette hypothèse attractive, notamment le transport des sucres non métabolisables et la possibilité des mutants de *S. cerevisiae* sans galactokinase d'accumuler du galactose.

BURGER et *al.* (1959) ont essayé de répondre à cette anomalie en suggérant que l'hexokinase pouvait servir quand même de transporteur sans qu'elle fût capable de fonctionner normalement ; ceci expliquerait l'analogie frappante des affinités relatives des différents sucres pour le système de transport et pour l'hexokinase. Cependant ce modèle n'explique pas pourquoi le sorbose qui n'a aucune affinité pour l'hexokinase peut être transporté.

Mais comme le fait remarquer VAN STEVERNINCK et ROTHSTEIN (1965) le système de transport, les kinases et les autres enzymes de la glycolyse sont certainement dans des arrangements hautement organisés si bien que la réaction de l'hexokinase peut être confondue avec la réaction de transport.

L'hypothèse généralement admise maintenant est celle qui postule que T le transporteur requiert une énergie d'activation pour donner T* sous forme active, état dans lequel il transporte le substrat à travers la membrane. Selon KEPES (1960) l'existence éphémère et en quantité catalytique de cette molécule expliquerait qu'on n'ait pu la mettre en évidence. Cette forme activée du substrat avec le transporteur se désactiverait spontanément ou se dissocierait de son transporteur à l'intérieur de la cellule.

On aurait donc, d'après CIRILLO (1961) :

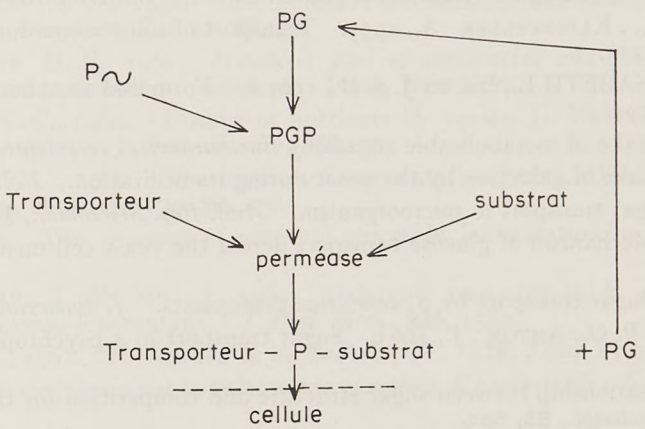


La participation de protéines dans les transports actifs a été clairement démontrée par la présence de perméases inductibles (ROBICHON-SZULMAJSTER, 1961 ;

Okada et *al.*, 1964). On ne sait pas encore expliquer leur rôle, mais on peut noter que ce rôle ne paraît pas être différent de celui des autres protéines inductibles qui ont été étudiées dans les systèmes de perméabilité chez les bactéries, par exemple la β-galactoside perméase d'*E. coli* (Kepes et *al.*, 1962). Récemment Pardee (1967) a obtenu des cristaux d'une protéine membranaire qui est un composant responsable, inductible, du transport actif du sulfate chez *Salmonella typhimurium*. Cette protéine a pu être identifiée par le fait qu'elle pouvait libérer les ions sulfate préalablement fixés sur une résine échangeuse d'ions. Cette protéine pourrait donc être le composant spécifique pour lier les substrats au système perméasique.

D'autre part, il ne fait plus de doute que les groupements phosphoryles membranaires participent au transport actif des sucres comme l'ont démontré les expériences d'inhibition par les ions UO_2^{++} et Ni^{++} (Cirillo, 1962 ; Rothstein, 1961 ; Van Stervernick, 1965).

Enfin, Deierkauf (1968) a montré la conversion du phosphatidylglycérol phosphate en phosphatidylglycérol au cours du transport actif du galactose chez la souche *gl*G_2. Au cours de la pénétration du tryptophane et de la glycine, on observe la même conversion. Le processus ne serait donc pas spécifique du transport des sucres. C'est pourquoi ces auteurs proposent le schéma suivant :



Hypothèse de Deierkauf et *al.* (1968)
PG = phosphatidylglycérol
PGP = phosphatidylglycérol phosphate

La perméase facilite la liaison transporteur—P—substrat.

Il faut également rappeler que Kundig et *al.* (1966) ont isolé une phosphotransférase chez différentes bactéries catalysant la phosphorylation de certains hexoses à partir du PEP (Phospho-énol-pyruvate).

Cette phosphotransférase a pu être séparée en trois fractions protéiques distinctes appelées : Enzyme I, Enzyme II et fraction thermostable. Si l'on soumet *E. coli* à un choc osmotique, les bactéries perdent 50 à 80 p. 100 de leur fraction thermostable et simultanément leur capacité de concentrer l'α-méthylglucoside ou le thiométhylgalactoside est réduite d'autant. Quand les cellules sont incubées en présence de la fraction thermostable purifiée, elles récupèrent leur capacité d'accumulation initiale. Ces résultats suggèrent que le système phosphotransférase est peut-être un composant des systèmes perméasiques des glucosides chez *E. coli*.

Malheureusement on n'a pas encore pu mettre en évidence de molécules pouvant jouer le rôle de transporteur dans les schémas que nous avons brièvement présentés et qui peuvent s'appliquer à la levure.

Reçu pour publication en novembre 1968.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALPER R. E., DAINKO J. L., SCHLENK F., 1967. Properties of yeast cell ghosts obtained by ribonuclease action. *J. Bacteriol.*, **93**, 759.

AVIGAD G., 1960. Accumulation of the tréhalose and sucrose in relation to the metabolism of α-glucosides in yeasts of defined genotype. *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 124.

BACON J. S., DAVIDSON E. D., JONES D., TAYLOR F., 1966. The location of chitin in the yeast cell wall. *Biochem. J.*, **101**, 36 *c*.

BAUERLE R. H., GARNER H., 1964. The assimilation of arginine and lysine in canavanine resistant and sensitive strains of *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 316.

BECHET J., WIAME J. M., GRENSON M., 1962. Control of synthesis of ornithine transcarbamylase with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. internation. Physiol. Biochim.*, **70**, 564.

BRITT E. M., GERHARDT P., 1958. Bacterial permeability. Total uptake of lysine by intact cells, protoplasts and cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Bacteriol.*, **76**, 288.

BRITTEN R. J., ROBERTS R. B., TRENCH E. F., 1955. Aminoacid adsorption and proteins synthesis. *Proc. nation. Acad. Sci.*, U. S., **41**, 863.

BRITTEN R. J., MCCLURE F. T., 1962. Aminoacid pool in *E. coli*. *Bacteriol. Rev.*, **26**, 292.

BURGER M., HEJMOVA L., , KLEINZELLER A., 1959. Transport of some mono-and di-saccharides into yeast cells. *Biochem. J.*, **71**, 233.

BURGER M., BACON ELISABETH E., BACON J. S. D., 1961 *a*. Form and location of invertase in the yeast cell. *Biochem. J.*, **78**, 504.

BURGER M., 1961 *b*. Uptake of metabolisable sugars by *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.*, **6**, 80.

BURGER M., 1961 *c*. Uptake of galactose by the yeast during its utilization. *Folia Microbiol.*, **6**, 136.

CIRILLO V. P., 1961. Sugar transport in microorganism. *Ann. Rev. Microbiol.*, **15**, 197.

CIRILLO V. P., 1962 *a*. Mechanism of glucose transport across the yeast cell membrane. *J. Bacteriol.*, **84**, 485.

CIRILLO V. P., 1962 *b*. Sugar transport by *S. cerevisiae* protoplasts. *J. Bacteriol.*, **84**, 1251.

CIRILLO V. P., WILKINS P. O., AMTON J., 1963. Sugar transport in a psychrophilic yeast. *J. Bacteriol.*, **86**, 1259.

CIRILLO V. P., 1968. Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in baker's yeast. *J. Bacteriol.*, **95**, 603.

COHEN G. N., MONOD J., 1957. Bacterial permeases. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 169.

COHEN G. N., 1967. *Le métabolisme cellulaire et sa régulation*. Hermann, Paris.

COLLANDER R., 1937. In « The cell ». *Biochemistry, Physiology Morphology*. Vol. II, 1961, Academic Press.

CONWAY E. J., 1954. Some aspects of ion transport through membranes. *Symp. Soc. Exp. Biol.* Cambridge **8**, 297.

COWIE D. B., WALTON B. P., 1956. Kinetics of formation and utilization of metabolic pools in the synthesis of protein and nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 211.

COWIE D. B., MCCLURE F. T., 1959. Metabolic pools and the synthesis of macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 236.

DANIELLI J. F., 1943. *Theory of penetration of a thin membrane* in *Permeability of natural membranes*. Cambridge Univ. Press. London and New York.

DANIELLI J. F., 1954. In *Active transport and secretion*. Academic Press, 502.

DAVIES A., 1956. Cité par de la FUENTE et SOES, 1962 dans : « Transport of sugars in yeasts. II. Mechanisms of utilization of di-sacharides and related glycosides ». *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 49.

DAVIS R. H., ZIMMERMANN, 1965. Cité par GRENSON M. dans : « Le transport des métabolites, en particulier des acides aminés, à travers les membranes cellulaires ». *Rev. Ferm. Industr. Alim.*, **22**, 7.

DE la FUENTE G., SOLS A., 1962. Transport of sugars in yeasts. II. Mechanisms of utilization of di-sacharides and related glycosides. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 49.

DEIERKAUF F. A., BOOIJ H. L., 1968. Phosphatides and sugar transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 214.

DELISLE A. L., PHAFF H. J., 1961 The release of nitrogenous substances by brewer's yeast. *Ann. Soc. Brew chem. Proc.*, **103**, 1961.

DUPUY P., MAUGENET MORFAUX J. N., 1966. Accroissement de la teneur en stérols dans les levures irradiées au cours de leur culture. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 295.

FERROLUZZI-AMES G., 1964. Uptake of aminoacids by *Salmonella Typhimurium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **104**, 1.

FINEAU J. B., 1961. *Chemical ultrastructure in living tissues* Edited by Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A.

FRIIS J., OTTOLENGHI P., 1959. Localization of invertase in a strain of yeast. *C. R. trav. lab. Carlsberg*, **31**, 259.

GALE E. F., 1947. The assimilation of aminoacids by bacteria I. Passage of certain aminoacids across the cell wall and their concentration in the internal environment of *Streptococcus faecalis*. *J. gen. Microbiol.*, **1**, 53.

GITS J., GRENSON M., 1967. Multiplicity of aminoacid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. III. Evidence for a specific methionine transporting system. *Biochim. Biophys. Acta*. **135**, 507.

GRENSON M., MOUSSET M., WIAME J. M., BECHET J., 1966. Multiplicity of the aminoacid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine transporting system. *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 325.

GRENSON M., 1966. Multiplicity of the aminoacid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Evidence for a specific lysine transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 339.

GRENSON M., 1967. Le transport des métabolites en particulier des acides aminés à travers les membranes cellulaires. *Rev. Ferm. Indust. Alim.*, **22**, 7.

HALPERN Y. S., LUPO M., 1965. Glutamate transport in wild type and mutant strains of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **90**, 1288.

HALVORSON H. O., SPIEGELMAN S., 1953. The effect of free aminoacid pool levels on the induced synthesis of enzymes. *J. Bacteriol.*, **65**, 496.

HALVORSON H. O., SPIEGELMAN S., 1953. Net utilization of free aminoacids during the induced synthesis of maltozymase in yeast. *J. Bacteriol.*, **65**, 601.

HALVORSON H. O., COHEN G. N., 1958. Incorporation des aminoacides endogènes et exogènes dans les protéines de la levure. *Ann. Inst. Pasteur*, **95**, 73.

HALVORSON H. O., COWIE D. B., 1961. *Metabolic pool of aminoacids and protein synthesis in yeast*. In *Membrane transport and metabolism*. Academic. Press, New York.

HARRIS G., THOMPSON C. C., 1960. Uptake of nutrients by yeasts. II. Maltotriose permease and utilization of maltotriose by yeastes. *J. Inst. Brewing*, **66**, 293.

HARRIS G., THOMPSON C. C., 1961. The uptake of nutrients by yeasts. III. The maltose permease of a brewing yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 176.

HAWTHORNE D. C., 1958. The genetics of α-methyl glucoside fermentation in *Saccharomyces*. *Heredity*, **12**, 273.

HORECKER B. L., THOMAS J., MONOD J., 1960. Galactose transport in *E. coli*. I. General properties as studied by a galactokinase-less-mutant. *J. Biol. chem.*, **235**, 1580.

KEPES A., COHEN G. N., 1962. *Permeation in the bacteria*, IV. **179**, Acad. Press, New York and London .

KEPES A , 1960. Études cinétiques sur la galactoside perméase d'*Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 70.

KEMPNER E. S., COWIE D. B., 1960. Metabolics pools and the utilization of aminoacid analogs for proteins synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 401.

KOTYK A., KLEINZELLER, 1963. Transport of D-xylose and sugar space in baker's yeast. *Folia Microbiol.*, **8**, 156.

KOTYK A., HOFER M., 1965. Uphill transport of sugars in the yeast *Rhodotorula gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 410.

KOTYK A., KLEINZELLER A., 1967 *a*. Affinity of the yeast membrane carrier for glucose and its role in the Pasteur effect. *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 106.

KOTYK A., 1967 *b*. Mobility of the free and loaded monosaccharide carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 112.

KOTYK A., 1967 *c*. Properties of sugar carrier in baker's yeast. *Folia Microbiol.*, **12**, 121.

KUNDIG W., KUNDIG F. D., ANDERSON B., ROSEMAN S., 1966. Cités par COHEN G. (1967) dans : *Le métabolisme cellulaire et sa régulation*, Hermann, Paris.

LEWIS M. J., PHAFF H. J., 1963. Release of nitrogenous substances by brewer's yeast. II. Effect of environmental conditions. *Ann. Soc. Brew Chem. Proc.*, **114**.

LEWIS M. J., PHAFF H. J., 1964. Release of nitrogenous substances by brewer's yeast. III. Shock excretion of amino acids. *J. Bacteriol.*, **87**, 1389.

LEWIS M. J., PHAFF H. J., 1965. Release of nitrogenous substances by brewer's yeasts. IV. Energetics in shock excretion of amino acids. *J. Bacteriol.*, **89**, 960.

LEWIS M. J., STEPHANOPOULOS D., 1967. Glucose induced release of aminoacid from *Saccharomyces carlsbergensis* by action on cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.*, **93**, 976.

LINDEGREEN C. C., 1957. Gene control of fermentation in *Saccharomyces* without control of permeability. *J. Bacteriol.*, **74**, 689.

MAC LELLAN W. L., LAMPEN J. O., 1963. Acid phosphatase of yeast. Localization and secretion by protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 324.

MAW G. A., 1963. The uptake of some sulfur containing aminoacids by brewer's yeast. *J. gen. Microbiol.*, **31**, 247.

MAW G. A., 1965. The role of sulfur in yeast growth and in brewwing. *Wall. Lab. Comm.*, **28** (95), 49.

MITCHELL P., 1961. Biological transport phenomena and the spatially anisotropic characteristics of enzyme systems causing a vector component of metabolism. In *Membrane transport and metabolism*, **22**, Ac. Press, New York.

MORFAUX J. N., DUPUY P., 1966. Comparaison de l'exsorption des acides aminés par une souche de *S. cerevisiae* et un mutant résistant à la canavanine. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **263**, 1224.

MORFAUX J. N., 1966. *Influence des radiations ionisantes sur la perméabilité aux acides aminés des cellules de levures*. D. E. A., Fac. Sciences, Orsay.

MOOR H., MUHLETHALER K., 1963. Fine structure in frozen etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609.

MUNCK B. G., 1968. Aminoacid transport by the small intestine of the rat. Evidence against interaction between sugars and aminoacid at the carrier level. *Biochim. Biophys. Acta*, **156**, 192.

OKADA H., HALVORSON H. O., 1963 *a*. Gene controlled facilitated diffusion and active transport of α-thio ethylglucopyranoside in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 221.

OKADA H., HALVORSON H. O., 1963. Comparaison of the active transport systems for α-thioethyl D-glucopyranoside and maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **86**, 966.

OKADA H., HALVORSON H. O., 1964 *a* et *b*. Uptake of α-thioethyl D-glucopyranoside by *Saccharomyces cerevisiae*.
a) Genetic control of facilited diffusion and active transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 538.
b) General characteristics of an active transport system. *Biochim. Biophys., Acat*, **82**, 547.

OTTOLENGHI P., 1966. Do yeasts form true protoplasts ? *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **35**, 363.

OVERTON E., 1895. In *the Cell. Biochemistry, Physiology, Morphology*, Vol. II, 1961. Academic Press, New York.

PONKOWA M., KOTIK A., 1967. Interaction of monosaccharides with aminoacid uptake by *S. cerevisiae*. *Curr. Mod. Biol.*, **1**, 189.

PARDEE A. B., 1967. Crystallization of a sulfate binding protein (permease) from *Salmonella typhiminium*. *Science*, **156**, 1627.

ROBERTSON J. J., HALVORSON H. O., 1957. The components of maltozymase in yeasts and their behaviour during deadaptation. *J. Bacteriol.*, **73**, 186.

ROBERTSON J. D., 1959. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* Cambridge, Engl., **16**, 3.

ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1961. Contribution à l'étude générale et physiologique du métabolisme du galactose chez la levure. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 81 et 185.

ROTHSTEIN A., 1961. Cité par VAN STERVENINCK (1968) dans : « Active and passive galactose transport in yeast ». *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 47.

ROTHSTEIN A., VAN STERVENINCK J., 1965. Sugar transport and metal binding in yeast. *J. gen. Physiol.*, **49**, 235.

SALAS M. L., VINUELA E., SALAS M., SOLS A., 1965. Citrate inhibition of phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **19**.

SCHARFF T. G., KREMER H., 1962. A tentative mechanism for the anaerobic transport of glucose, fructose and mannose in yeast. *Arch. Biol. Bioch.*, **97**, 192.

SCHLENK F., DAINKO J. L., 1966. Action of ribonuclease preparations on viable yeast cells and spheroplasts. *J. Bacteriol.*, **89**, 428.

SCHWARTZ J. H., MAAS W. K., SIMON E. J., 1959. Aminoacids in mutants of *E. coli* resistant to L-canavanine and D-serine. *Biochim. Biophys., Acta*, **32**, 582.

SOLS A., de la FUENTE G., VINUELA E., HEREDIA C. F., 1963. Feedback control mechanisms involved in the Pasteur effect. *Biochem. J.*, **89**, 33.

SORSOLI W. A., SPENCE K. D., PARKS L. W., 1964. Aminoacid accumulation in methionine resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **88**, 20.

SPIEGELMAN S., HALVORSON H. O., 1954. On the role of the inducer in the synthesis of maltase in yeast. *J. Bacteriol.*, **68**, 265.

STREIBLOVA E., 1968. Surface structure of yeast protoplasts. *J. Bacteriol.*, **95**, 700.

SURDIN Y., SLY W., SIRE J., BORDES A. M., ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1964. Système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae* : propriétés et contrôle génétique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **258**, 5046.

SURDIN Y., SLY W., SIRE J., BORDES A. M., ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1965. Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez *S. cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 546.

SUTTON D. D., LAMPEN J. O., 1962. Localization of sucrose and maltose fermenting systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 303.

TAYLOR E. S., 1947. The assimilation of aminoacids by bacteria III. Concentration of free aminoacids in the internal environment of various bacteria and yeasts. *J. gen. Microbiol.*, **1**, 86

VAN STEVERNINCK J., 1963. Role of polyphosphate in glucose uptake by yeasts cells. *Biochem. J.*, **88** (2), 25.

VAN STEVERNINCK J., BOOIJ H. L., 1964. The role of polyphosphates in the transport mechanism of glucose in yeast cells. *J. gen. physiol.*, **48** (1), 43.

VAN STEVERNINCK J., ROTHSTEIN A., 1965. Sugar transport and metal binding in yeast. *J. gen. Physiol.*, **49**, 235.

VAN STEVERNINCK J., DAWSON E. C., 1968. Active and passive galactose transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 47.

VAN UDEN N., 1967. Transport limited fermentation and growth of *S. cerevisiae* and its competitive inhibition. *Arch. Mikrobiol.*, **58**, 155.

WIAME J. M., BECHET J., MOUSSET M., GRENSON M., 1962. Indication of a specific regulatory binding protein for ornithine transcarbamylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Res. Commun*, **21**, 226.

WIDDAS W. F., 1954. Facilitated transfer of hexoses across the human erythrocyte membrane. *J. Physiol.*, **125**, 163.

WILBRANDT W., ROSENBERG T., 1961. The concept of carrier transport and its corollaries in pharmacology *Pharmacol., Rev.*, **13**, 109.

WILKINS P. O., O'KANE D. J., 1964. Accumulation of glucose and galactose by *Streptococcus faecalis*. *J. gen. Microbiol.*, **34**, 389.

WILKINS P. O., CIRILLO V. P., 1965. Sorbose counterflow as a mesure of intracellular glucose in baker's yeast. *J. Bacteriol.*, **90**, 1605.

WILKINS P. O., 1967. D-arabinose countertransport in baker's yeast. *J. Bacteriol.*, **93**, 1565.

Ann. Technol. agric., 1968, **17** (4).

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1968

C. Bizeau. — Étude de la respiration résiduelle de cellules broyées de *Saccharomyces cerevisiae* hansen 77

R. Cordonnier, A. Dugal. — Les activités protéolytiques du raisin 189

P. Feillet, A. Bourdet. — Les protéines solubles du blé.

I. — Isolement et caractérisation des albumines et des globulines 217

II. — Fractionnement des albumines par chromatographie sur deae-cellulose et par électrophorèse préparative : isolement d'une protéine électrophorétiquement homogène 267

C. Flanzy, M. Flanzy, P. André, Y. Chambroy. — Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose 287

M. Flanzy, C. Poux, P. Dubois, P. Dupuy. — Fermentation du moût de raisin en continu. Formation des alcools supérieurs 207

B. Godon, L. Petit. — Action des ultrasons sur les propriétés physico-chimiques du gluten. II. — Traitement du gluten de farine normale 103

T. Ivanov, Anna Ivanova. — Sur l'oxydation du moût de raisin. III. — Activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase au cours de la maturation du raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté*..... 333

C. Journet, Moutounet. — Comparaison des alcools supérieurs des eaux-de-vie d'Armagnac et des whiskies 151

Simone Kuzdzal-Savoie. — L'insaponifiable du beurre. I. — Essais des techniques d'étude 115

Simone Kuzdzal-Savoie. — Méthylestérification sélective des acides gras libres et des acides gras des glycérides 341

Christiane Mercier. — Contribution à l'étude de la structure du grain d'amidon au moyen de méthodes physiques et enzymatiques (résumé de thèse). 237

J. Mourgues, M. Bourzeix. — Évolution de l'état d'oxydoréduction et des teneurs en flavonols et en anthocyanes du raisin au cours de son développement 53

Andrée Ournac. — Riboflavine pendant la fermentation du jus de raisin et la conservation du vin sur lies 67

J. Pelhate. — État thermodynamique de l'eau dans les grains de blés sains ou altérés 227

C. Pompei. — Étude sur la composition des concentrés d'arômes de pommes à cidre 5

C. Poux, S. Aubert. — Corrélations entre la constitution en composés phénoliques des vins, la température de vinification et les caractéristiques générales de l'année 299

C. Poux. — Composés azotés dans les vins de goutte, vins de presse et vins de lies 315

J. Puisais, A. Guiller, J. Lacoste, P. Huteau. — Dosage spectrophotométrique des tanins 277

J. Rivière, Y. Cassegrain. — Étude des accidents de fabrication des conserves de champignons de couche (*Agaricus hortensis*) provoqués par des bactéries thermophiles. I. — Recherche des souches responsables 175

Notes.

Émilienne Bizeau, C. Bizeau. — Dosage des protéines dans les préparations contenant du sorbitol 253

D. Boubals, P. Truel, M. Bourzeix, V. Kovac, T. Giosanu. — Étude des différentes couleurs de baies chez la Vigne (*Vitis vinifera*) 257

M. Flanzy, S. Aubert. — Méthode de purification de l'ensemble des composés phénoliques du vin 93

L. Körmendy, B. Jacquet, G. Mocquot. — Essai de détermination du degré de cuisson des jambons grâce à l'épreuve de la phosphatase 159

Suzanne Lafon-Lafourcade. — Utilisation d'un compteur de particules pour la numération et l'étude de la taille des levures de vin 241

Mise au point.

C. Divies, J.-N. Morfaux. — Perméabilité des levures aux sucres et aux acides aminés 355

Chronique des livres 167

CONTENTS

C. Bizeau. — Investigating the residual respiration of crushed cells of *Saccharomyces cerevisiae* hansen 77

R. Cordonnier, A. Dugal. — The proteolytic activities on the grape 189

P. Feillet, A. Bourdet. — Soluble wheat proteins.

I. — Isolation and characterization of albumins and globulins 217

II. — Fractionation of albumins by chromatography on deae-cellulose and by preparative electrophoresis. Isolation of an electrophoretically homogeneous protein 267

C. Flanzy, M. Flanzy, P. André, Y. Chambroy. — Fixation in the darkness of an anaerobiotic medium, by berries of the grape, of the gazeous $^{14}CO_2$.. 287

M. Flanzy, C. Poux, P. Dubois, P. Dupuy. — Continuous fermentation of grape juice. Formation of higher alcohols 207

B. Godon, L. Petit. — Ultrasonic effects on the physico-chemical properties of gluten 103

T. Ivanov, Anna Ivanova. — The oxidation of grape must. III. — Polyphenoloxidase and peroxidase activities during ripening of the grape in the *Muscat rouge, Dimiat, Riesling*, and *Aligoté* varieties 333

C. Jouret, M. Moutounet. — Comparing the higher alcohols of Armagnac and whisky spirits 151

Simone Kuzdzal-Savoie. — The unsaponifiable matter of butter. I. — Methods 115

Simone Kuzdzal-Savoie. — Selective esterification of glycerides and free fatty acids 341

Christiane Mercier. — Contribution to the study of the starch-gram structure by means of physical and enzymatic methods (Summary of the thesis) 237

J. Mourgues, M. Bourzeix. — Evolution of the state of oxydoreduction in the same way as flavonol and anthocyanin contents during maturation of grapes..... 53

Andrée Ournac. — Riboflavin during fermentation of the grape juice, and keeping of the wine on lees 67

J. Pelhate. — Thermodynamic state of the water in healthy or infected grains of Wheat 227

C. Pompei. — Investigation on the composition of flavour concentrates of cider apples 5

C. Poux, S. Aubert. — Correlations between the composition of a phenolic compound in wines, the vinification temperature and the general characteristics of the vintage 299

C. Poux. — Nitrogen content of first pressings of wines, press wines and lees wines 315

J. Puisais, A. Guiller, J. Lacoste, P. Huteau. — Spectrophotometric measurement of tannins 277

J. Rivière, Y. Cassegrain. — Study of defects in the manufacture of tinned cultivated mushrooms (*Agaricus hortensis*) caused by thermophile bacteria. I. — Investigation on responsable strains 175

Notes.

Émilienne Bizeau, C. Bizeau. — Determination of the proteins in preparations containing sorbitol 253

D. Boubals, P. Truel, M. Bourzeix, V. Kovac, T. Giosanu. — Study of the different colourings of vine-berries (*Vitis vinifera*) 257

M. Flanzy, S. Aubert. — Method for purifying the phenolic compound of wine 93

L. Körmendy, B. Jacquet, G. Mocquot. — Experimental determination of the degree of ham cooking by means of the phosphatase test 159

Suzanne Lafon-Lafourcade. — Use of a particle counter for the numeration and study of the size of wine yeast 241

Review.

C. Divies, J.-N. Morfaux. — Permeability of yeast to sugar and amino-acids. 355

Book review 167

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques. etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :

a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *Références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les artciles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signaletique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera, en plus, le nom de l'auteur du chapitre cité, les noms des rédacteurs principaux, précédés de la mention « in ».

La mention de « communication personnelle » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffre arabe visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une seule épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne (France), ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy - en - Josas. Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur de la publication : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 03-1969.

Dépôt légal : 1er *trimestre* 1969. *N° d'impression :* 216.

P. 11

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 18
1969

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 18 1969 NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (1), 5-16.

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE DES PRODUITS BIOLOGIQUES SOLIDES OU PÂTEUX (1)

R. DRAPRON et L. SCLAFANI

Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales, C. E. R. D. I. A., 91 - Massy
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La méthode proposée permet de déterminer, de manière spécifique, l'activité lipolytique de divers produits solides ou pâteux. Son principe est fondé sur le dosage, par chromatographie en phase gazeuse, de la quantité d'acides gras libérés dans un mélange peu hydraté de la substance à examiner et d'huile d'olive.

L'huile d'olive est incorporée au produit préalablement délipidé. Le mélange est placé à température et humidité relative constantes. Au bout d'un temps déterminé, les lipides sont extraits ; les acides gras sont séparés globalement par chromatographie sur couche mince, puis successivement élués, estérifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse.

Toutes ces opérations sont effectuées en présence d'un antioxygène pour éviter l'oxydation des acides insaturés.

En raison de l'incorporation d'un étalon interne aussitôt après lipolyse, la récupération quantitative des acides gras n'est pas nécessaire et il en résulte que toutes les opérations gagnent en simplicité et rapidité d'exécution.

Cette méthode présente l'intérêt de pouvoir déterminer la nature des différents acides gras libérés, d'en apprécier les proportions relatives et de suivre la cinétique de la lipolyse dans des conditions très proches de celles existant dans les milieux naturels, relativement peu hydratés. En outre, elle se prête facilement à des déterminations en série.

INTRODUCTION

Au cours de l'entreposage et des traitements technologiques de certains produits végétaux et animaux, l'intensité de la lipolyse intervient, parfois de façon prépondérante, sur la valeur d'utilisation de ces produits. La détermination titrimétrique globale de « l'acidité grasse » libérée dans ces conditions peut constituer un indice

(1) Ce travail a été effectué dans le cadre du contrat de recherches E9 (10) 45 (Grant Fg Fr 115) établi entre l'Institut national de la Recherche agronomique et le Département de l'Agriculture des Etats-Unis.

de l'altération produite, mais elle ne reflète pas la seule activité des lipases, car les acides gras libérés peuvent être accompagnés d'acides à courtes chaînes formés par oxydation chimique ou enzymatique des lipides, ou résultant du métabolisme microbien. Aussi, la connaissance précise de l'activité lipolytique, qui peut représenter une notion essentielle dans l'évolution de nombreux processus technologiques, nécessite-t-elle la mise en œuvre d'autres techniques de mesure. De plus, sur le plan théorique, la mesure de cette activité, par des méthodes spécifiques et sensibles, permet une meilleure analyse des caractéristiques et modalités d'action des lipases dans leurs milieux naturels.

Un certain nombre de méthodes ont été proposées jusqu'à présent pour apprécier l'activité lipolytique dans les milieux biologiques. Cependant, il convient de souligner que les méthodes mettant en œuvre un substrat soluble dans l'eau ne peuvent convenir. Il est en effet bien établi actuellement que le caractère spécifique de la lipase est d'exercer son action à une interface eau-lipide (SARDA et DESNUELLE, 1958). De ce fait, trois méthodes restent essentiellement utilisables, cependant elles appellent encore quelques remarques.

La méthode de DESNUELLE et *al.* (1955), mesurant à pH constant la quantité d'acides gras libérés, en fonction du temps, à partir d'huile d'olive en émulsion, est une des plus spécifiques. Initialement mise au point pour l'étude de la lipase pancréatique, elle s'est révélée pratiquement inutilisable pour un très grand nombre de produits, où l'accroissement de l'acidité au cours de l'essai est dû à la manifestation prépondérante de processus enzymatiques autres que la lipolyse proprement dite. Elle reste néanmoins spécialement bien adaptée aux produits présentant une forte activité lipolytique, à condition cependant de procéder à un essai à blanc pour tenir compte des ions H^+ libérés par d'autres systèmes enzymatiques, dont les substrats sont présents dans la substance examinée (DRAPRON et UZZAN, 1968).

Dans les deux autres méthodes, les substrats « interfaciaux » (oléate de méthyle et monoléate de glycérol) sont choisis en vue de permettre le dosage spécifique des produits d'hydrolyse.

La méthode de ROTHE (1958) consiste à doser l'acide oléique formé dans un mélange peu hydraté de produit enzymatique et d'oléate de méthyle, par colorimétrie du savon de cuivre. Cette technique ne peut convenir lorsque l'on utilise de l'huile d'olive comme substrat, divers types de complexes cuivriques étant susceptibles de se former en présence de glycérides et des produits d'hydrolyse partielle qui accompagnent l'acide oléique. Avec ce substrat, cependant, le dosage acidimétrique peut fournir des résultats satisfaisants, dans la mesure où des essais témoins convenablement adaptés sont réalisés, bien qu'il soit parfois difficile de faire la part revenant aux divers acides formés sous l'action d'enzymes autres que la lipase.

La méthode de LUCHSINGER (1955), mettant en œuvre le dosage du glycérol libéré au cours de la lipolyse de la monoléine, présente l'inconvénient d'utiliser un substrat partiellement soluble dans l'eau dont les émulsions sont difficilement reproductibles. En outre, les essais témoins ne permettent pas de tenir compte, lors du dosage du glycérol, de l'interférence possible de glucides solubles libérés sous l'action de glucidases sur des substrats insolubles, éventuellement présents dans la préparation enzymatique examinée.

Par ailleurs, la lipase étant généralement présente en petite quantité et peu soluble dans l'eau, il est pratiquement impossible d'envisager son extraction pour rendre

les dosages par les méthodes de DESNUELLE et de LUCHSINGER plus spécifiques.

Aucune des techniques précédentes ne présente donc à la fois une spécificité et une sensibilité suffisantes pour apprécier l'activité lipolytique (vis-à-vis des triglycérides de l'huile d'olive) dans des milieux complexes, en particulier dans des milieux relativement peu hydratés. C'est pourquoi nous avons été conduits à mettre au point une nouvelle méthode répondant à ces différentes exigences.

MÉTHODE PROPOSÉE

PRINCIPE

La mesure de l'activité lipolytique est fondée sur la détermination, par chromatographie en phase gazeuse, de la quantité d'acides gras (A. G.) libérés au bout d'un temps donné dans un mélange du produit à examiner et d'huile d'olive, placé à température et humidité relative constantes.

DOMAINE D'APPLICATION

La méthode est applicable aux produits biologiques solides ou pâteux, en particulier à ceux présentant de faibles activités lipolytiques.

DESCRIPTION

1. *Réactifs*

1-1. Substrat : huile d'olive vierge, présentant une acidité libre inférieure à 1 p. 100.
1-2. Solvants purs P. A. : hexane ; oxyde d'éthyle anhydre, exempt de peroxydes (1); acide formique ; méthanol anhydre ; 2-(β-éthoxy, éthoxy) éthanol (carbitol) (2) ; sulfure de carbone.
1-3. Acide heptadécanoique (acide margarique).
1-4. Soluton d'acide sulfurique 6 N.
1-5. 2-6 ditertiairebutylparacrésol (butylated hydroxytoluene ou B. H. T.).
1-6. « Kieselgel G » à 13 p. 100 de plâtre (selon STAHL).
1-7. Solution d'hydroxyde de potassium à 60 p. 100.
1-8. N-méthyl, N-nitroso, paratoluènesulfonamide (M. N. S. A.).
1-9. Iode pur.
1-10. Azote pur.

2. *Appareillage*

2-1. Étuve à température constante (30°C ± 0,5).
2-2. Tube à sorption suivant DRAPRON et GUILBOT (1962) (fig. 1).
2-3. Centrifugeuse.
2-4. Évaporateur rotatif sous vide.
2-5. Matériel pour chromatographie sur couche mince.
2-6. Dispositif pour élution des A. G. (fig. 2).
2-7. Dispositif pour estérification des A. G. suivant SCHLENK et GELLERMAN (1960) (fig. 3).
2-8. Chromatographe en phase gazeuse équipé d'une colonne appropriée pour la séparation des esters méthyliques des A. G.

(1) L'oxyde d'éthyle distillé sur $SnCl_2$, puis stocké en présence de 0,01 p. 100 de B. H. T. se conserve plusieurs semaines sans risque de formation de peroxydes.

(2) Le carbitol est purifié par chauffage à 110°C pendant une heure, en présence de 5 p. 100 de potasse, suivi d'une distillation sous pression réduite (environ 12 mm) en recueillant la fraction passant à 90°C environ. Le solvant obtenu ne doit pas présenter de coloration jaune en présence de potasse.

3. *Préparation de l'échantillon*

L'échantillon, convenablement déshydraté, sous vide en présence de P_2O_5 ou par cryodessiccation, est broyé si nécessaire pour présenter une dimension de particules inférieure à 700 μ. Il est ensuite délipidé au Soxhlet, successivement à l'hexane et à l'oxyde d'éthyle, à une température inférieure à 35°C.

4. *Mode opératoire*

4-1. *Préparation du mélange de produit à examiner avec le substrat.*

L'huile d'olive (100 mg) est incorporée au produit délipidé (2 g) sous forme d'une solution dans l'oxyde d'éthyle (10 ml) de façon à obtenir une concentration de 5 p. 100 de substrat par rapport à la préparation enzymatique. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation, tout d'abord à l'air libre en agitant constamment le mélange, puis sous vide, au dessiccateur en présence de P_2O_5.

4-2. *Conditions de lipolyse.*

Le mélange est mis à incuber, sous vide de la trompe à eau, dans un tube à sorption, à la température de 30°C et à une humidité relative de 80 p. 100 environ (fournie par la solution d'acide sulfurique 6 N).

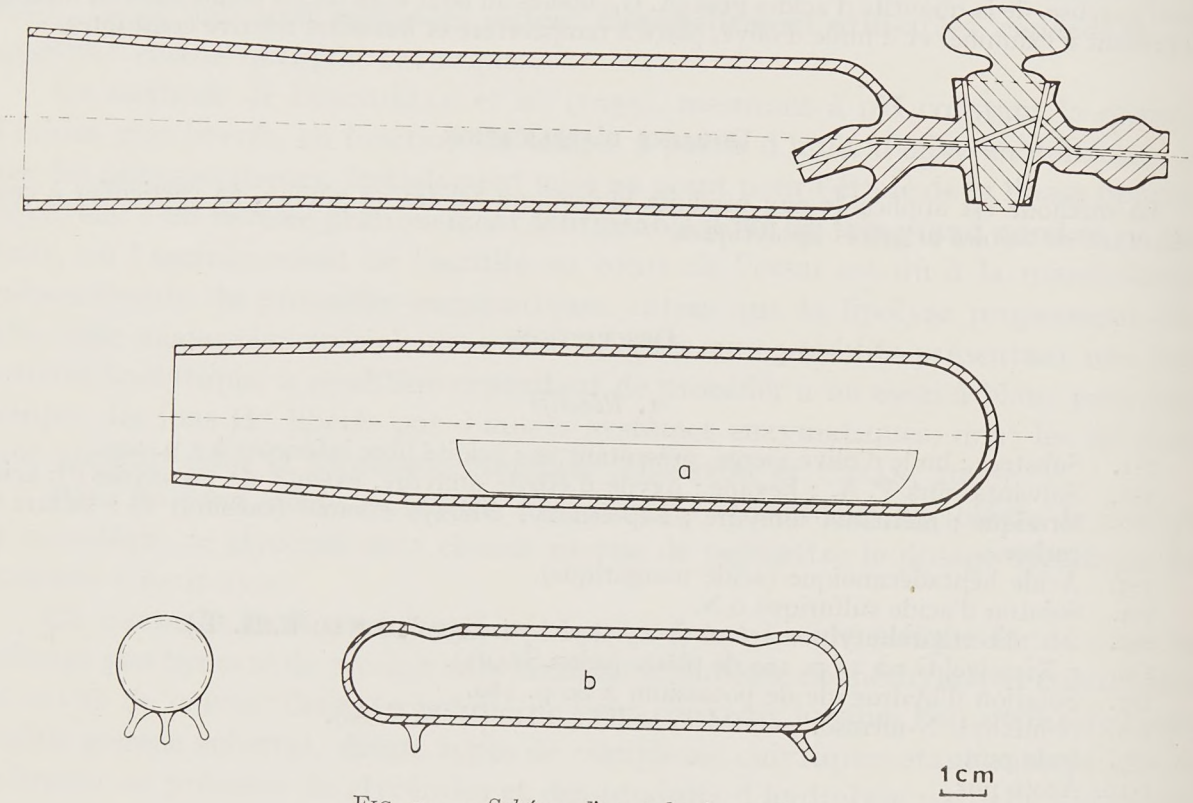


FIG. 1. — *Schéma d'un tube à sorption*
a : Capsule contenant l'échantillon
b : Réservoir d'acide sulfurique

4-3. *Extraction des lipides.*

Au bout de 72 heures, le produit est transféré dans un tube de centrifugeuse et mis au contact de 50 ml environ d'oxyde d'éthyle contenant une quantité connue d'acide margarique [1] qui servira d'étalon interne, lors de la chromatographie en phase gazeuse. Après agitation du mélange pendant quelques minutes, la suspension est centrifugée. La solution surnageante est décantée dans un ballon rodé puis concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide.

4-4. *Séparation globale des A. G. par chromatographie sur couche mince.*

Une partie aliquote de la solution, variable suivant la quantité d'acides gras présents, est déposée sous forme de bande horizontale, sur une couche mince de kieselgel, d'épaisseur 400 à 750 μ. Le développement du chromatogramme est effectué à 23°C au moyen d'un mélange d'hexane et d'oxyde

[1] Cette quantité est variable (1 à 10 mg) suivant la teneur présumée en A. G. libérés.

d'éthyle (60-40, v/v), contenant 1 p. 100 d'acide formique. Après évaporation du mélange de solvants imprégnant la couche mince, les composés lipidiques séparés sont localisés de la façon suivante : une plaque de plexiglass, de dimensions identiques à celle de la chromatoplaque, possédant deux fentes latérales de 10 mm de large, est disposée à la surface du chromatogramme, de façon à ce que les fentes soient parallèles à la direction de migration des solutés, et maintenue en place au moyen de deux bracelets de caoutchouc. L'ensemble est introduit dans une cuve remplie de vapeurs d'iode. Les composés lipidiques séparés sont ainsi révélés par l'iode fixé à la surface de la couche mince laissée libre par les fentes latérales. Une chromatographie d'un mélange de substances témoins ayant été préalablement effectuée, il est alors possible de définir la position des A. G. sur la partie du chromatogramme non exposée aux vapeurs d'iode (1). Un examen de la chromatoplaque placée au-dessus d'une source lumineuse permet de situer de façon plus précise la place occupée par les triglycérides en excès et, par conséquent, de récupérer la partie de la couche mince contenant les A. G. sans risque d'entraîner une partie des triglycérides (2).

4-5. *Élution des A. G.*

La partie de la couche mince contenant les A. G. est détachée de la plaque de verre à l'aide d'une spatule, puis récupérée à l'aide d'un microaspirateur. Les acides sont ensuite élués directement dans l'aspirateur par de l'oxyde d'éthyle et la solution obtenue recueillie dans une petite fiole (fig. 2).

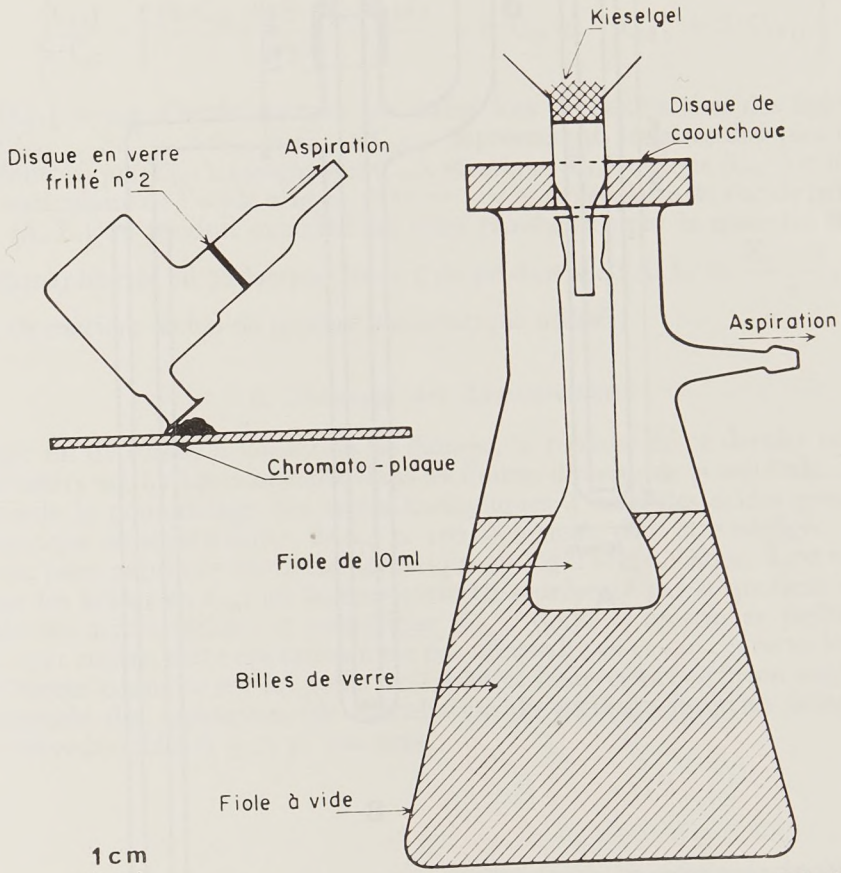


FIG. 2. — *Schéma des dispositifs utilisés pour la récupération et l'élution des acides gras séparés par chromatographie en couche mince*

4-6. *Préparation des esters méthyliques.*

Les A. G. sont transformés en esters méthyliques par le diazométhane, selon la méthode de SCHLENK et GELLERMANN (1960). Suivant la concentration présumée en A. G. de la solution obtenue en 4-5, une partie aliquote ou la totalité de cette solution est utilisée dans ce but.

(1) Les Rf des composés séparés sont les suivants : B. H. T. (0,85), triglycérides (0,70), acides gras (0,40), diglycérides 1-3 (0,25), diglycérides 1-2 (0,20), monoglycérides (0,04).

(2) Il est encore possible de situer les positions relatives des constituants lipidiques par examen en lumière UV du chromatogramme préalablement soumis à une pulvérisation d' « Ultraphor ». Selon WEST et ROWBOTHAM (1967) la présence de cette substance ne gêne pas lors des opérations ultérieures.

Les réactifs sont répartis de la manière suivante dans les différents tubes de l'appareil représenté sur la figure 3 (1) :

tube A : environ 10 ml d'oxyde d'éthyle ;

tube B : 0,7 ml de carbitol, 0,7 ml d'oxyde d'éthyle et 1 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium ;

tube C : 5 à 10 ml de la solution des A. G. dans l'oxyde d'éthyle à 10 p. 100 de méthanol.

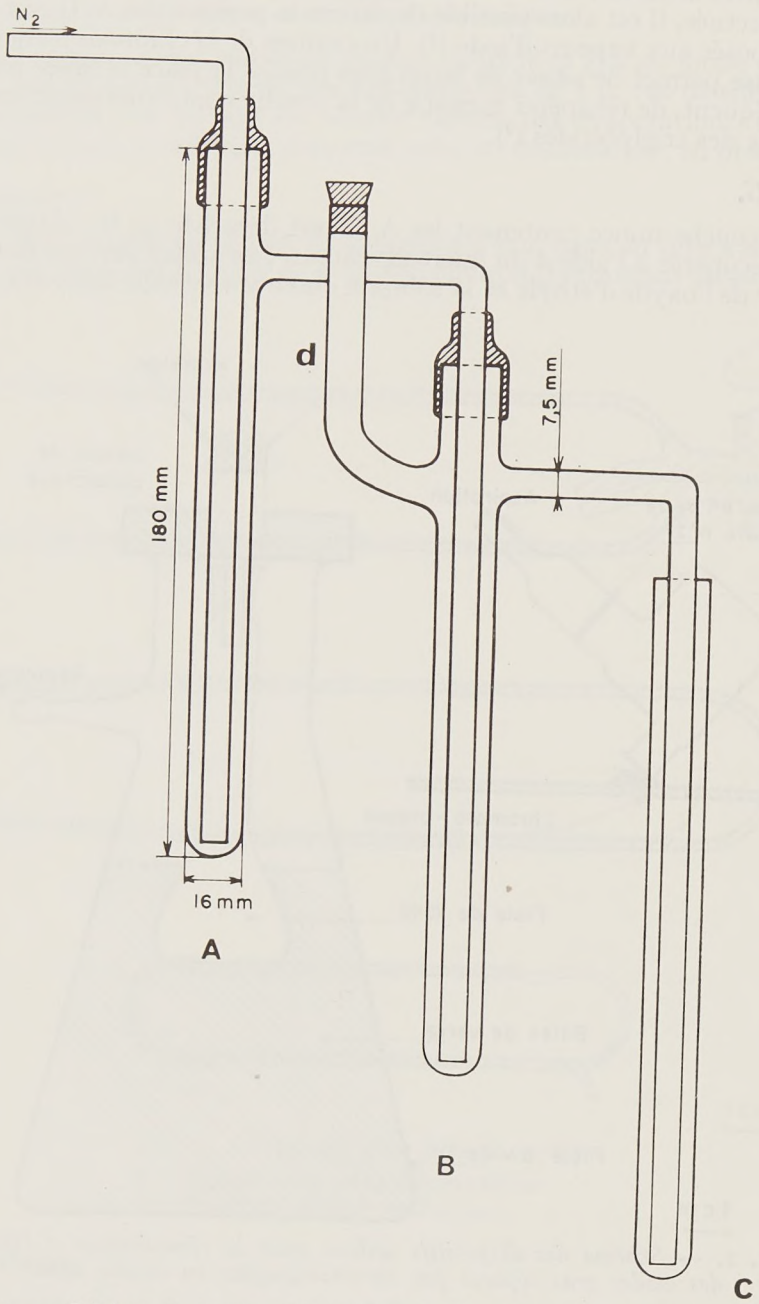


FIG. 3. — *Schéma de l'appareil utilisé pour l'estérification des acides gras,* suivant SCHLENK et GELLERMAN (1960)

Par l'intermédiaire de l'ajustage latéral *d* du tube B, introduire environ 2 millimoles de M.N.S.A. (en solution dans 1 ml d'oxyde d'éthyle) par milliéquivalent d'A. G.

Un courant d'azote (débit approximatif : 6 ml/mn) saturé en vapeur d'oxyde d'éthyle en A, entraîne le diazométhane, produit en B, jusqu'en C où a lieu l'estérification (2).

(1) Les tubes A et B doivent être munis de bouchons de caoutchouc, ce qui évite tout risque d'explosion du diazométhane.

(2) Il est recommandé d'opérer sous une hotte en raison de la toxicité du CH_2N_2.

Dès que l'on observe une coloration jaune dans le tube C, ce dernier est retiré de l'appareil. L'éther est alors évaporé par passage d'un courant d'azote dans la solution, ce qui élimine en même temps, dès le début de l'opération, le léger excès de CH_2N_2 présent. Le résidu obtenu est repris par une quantité convenable de sulfure de carbone.

4-7. *Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques.*

Une partie aliquote de la solution des esters méthyliques est soumise à la chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne appropriée et un détecteur suffisamment sensible. L'aire des pics des différents acides gras est mesurée.

4-8. *Essai à blanc.*

Effectuer les opérations (4-3), (4-4), (4-5), (4-6), (4-7) sur le mélange de préparation enzymatique et de substrat au temps zéro.

5. *Expression des résultats*

La quantité totale d'A. G. (exprimée en mg d'acide oléique) présente, d'une part dans la préparation enzymatique après 72 heures d'incubation (X), d'autre part dans la préparation au temps zéro (x), est calculée au moyen de la formule suivante :

$$\frac{[C_{17}]}{S\cdot C_{17}} \cdot \left[\frac{(S\cdot C_{16} + S\cdot C_{16:}) \, 282}{256} + S\cdot C_{18} + S\cdot C_{18:} + S\cdot C_{18::} \right]$$

dans laquelle $[C_{17}]$ = mg d'acide margarique utilisé lors de l'extraction des lipides après incubation ; $S.C_{16}$, $S.C_{16:}$, $S.C_{17}$, $S.C_{18}$, $S.C_{18:}$: $S.C_{18::}$ représentent les aires des pics des acides palmitiques (C_{16}), palmitoléique ($C_{16:}$), margarique (C_{17}), stéarique (C_{18}), oléique ($C_{18:}$) et linoléique ($C_{18::}$) ; 282 = masse moléculaire de l'acide oléique ; 256 = masse moléculaire de l'acide palmitique.

L'activité (A. L.) du produit examiné est alors représentée par la quantité totale d'A. G. (en mg d'acide oléique) libérée en 72 heures, par 1 g de produit sec : A. L. $= \frac{X - x}{n}$, n représentant la quantité (en g de matière sèche) de produit enzymatique utilisé.

6. *Précision des déterminations*

En utilisant un détecteur à ionisation de flamme, la réponse de ce dernier est proportionnelle à la quantité d'esters méthyliques injectés, dans les limites d'erreur de la méthode.

Si on assimile le pourcentage des esters méthyliques à celui des acides gras correspondants, l'erreur systématique ainsi introduite, de 0,2 p. 100 seulement, peut être négligée.

Par ailleurs, pour exprimer l'activité lipolytique en mg d'acide oléique, il est nécessaire de faire intervenir, pour les acides en C_{16}, un facteur correctif représenté par le quotient des poids moléculaires respectifs des acides oléique et palmitique ($C_{16:}$: toujours présent en petite quantité, étant assimilé à C_{16}) ; par contre, cette opération n'est pas nécessaire en ce qui concerne les acides stéarique et linoléique, l'erreur commise sur les poids moléculaires intervenant de façon négligeable.

Pour l'ensemble des opérations (de l'incubation du mélange jusqu'au dosage des A. G.) les résultats sont reproductibles à $\pm$ 5 p. 100 près.

JUSTIFICATION DES CONDITIONS OPÉRATOIRES

Obtention de la préparation enzymatique

La délipidation préalable de la préparation enzymatique présente l'intérêt, d'une part, d'éliminer la majorité des constituants lipidiques complexes qui risquent d'interférer sur la séparation et la détermination des A. G., d'autre part, de détruire en grande partie les microorganismes présents. Selon ROTHE (1958), les conditions d'extraction (température, nature des solvants, temps de traitement) ne sont pas préjudiciables à l'activité de la lipase.

L'état de division des produits intervient sur le taux de lipolyse : plus les parti-

cules sont petites, meilleure est la répartition du substrat, ce qui entraîne une augmentation de la quantité d'A. G. libérés. Cependant, on peut considérer, avec ROTHE, que les conditions de broyage utilisées permettent d'obtenir une vitesse de réaction optimale.

Conditions de lipolyse

La trioléine constitue un substrat de choix pour la mesure de l'activité lipolytique mais, en pratique, il est plus commode d'utiliser de l'huile d'olive, précisément riche en trioléine.

ROTHE a montré que l'optimum d'action de la lipase est atteint pour une concentration en substrat de 5 p. 100 et c'est cette valeur que nous avons retenue.

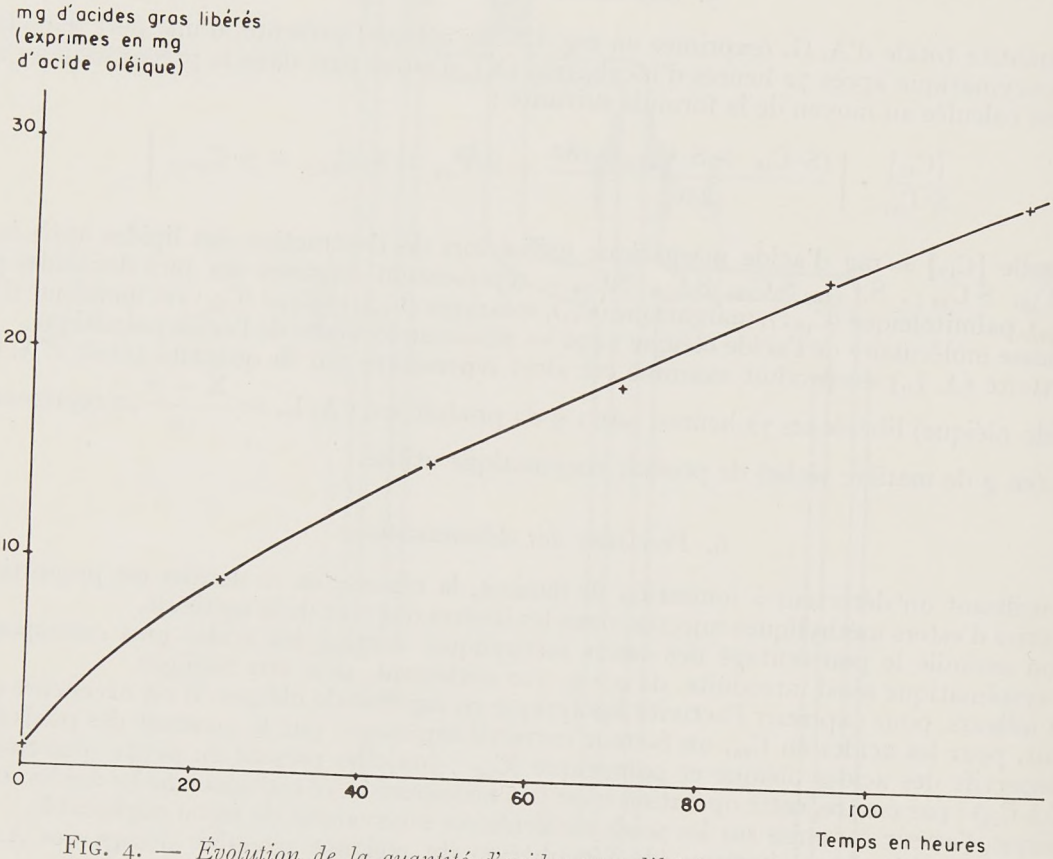


FIG. 4. — *Évolution de la quantité d'acides gras libérés en fonction du temps, à 30°C et 80 p. 100 d'humidité relative, dans un mélange de son de blé et d'huile d'olive*

Une dégradation des acides gras insaturés étant susceptible de se produire au cours de l'incubation des préparations enzymatiques, soit par autooxydation, soit par l'intervention d'une lipooxygénase, nous avons incorporé du B.H.T. comme inhibiteur de ces réactions.

En raison de la faible hydratation du milieu, l'utilisation d'un système tampon pour fixer le pH à une valeur déterminée pose des problèmes complexes. Aussi, avons nous préféré rester dans les conditions naturelles où l'état d'acidité est fixé par les constituants du mélange.

La teneur en eau doit être amenée à une valeur optimum : trop faible, la mobilité de l'enzyme et du substrat est diminuée et la vitesse de réaction est fortement ralentie ; trop forte, elle inhibe l'action de la lipase (ROTHE, 1958 ; DRAPRON et UZZAN, 1968). D'après ROTHE, la température optimum est d'autant plus élevée que

l'humidité est plus faible. Pour la température de 30°C, l'hydratation est fixée par mise en équilibre avec une atmosphère d'une humidité relative de 80 p. 100. Dans ces conditions d'hydratation, la répartition de l'eau s'effectue de façon beaucoup plus homogène que lorsqu'elle est incorporée à l'état liquide ; l'équilibre des tensions de vapeur est réalisé au bout de 5 à 8 heures. En outre, nous avons vérifié qu'à cette humidité relative et en opérant sous vide, un développement de microorganismes, de moisissures en particulier, n'est guère à redouter.

Généralement, la courbe représentant, en fonction du temps, la quantité d'A. G. libérés (exprimée en acide oléique) fait apparaître deux phases de la réaction lipolytique : la teneur en A. G. augmente rapidement tout d'abord, puis continue à croître plus lentement, de façon sensiblement linéaire (fig. 4). C'est donc dans cette deuxième phase de la lipolyse que les résultats présentent le maximum de sécurité, c'est pourquoi nous avons fixé un temps d'incubation de 72 heures.

Un essai à blanc, réalisé en utilisant la même préparation enzymatique dont la lipase a été inactivée par traitement hydrothermique, montre que la quantité d'acide gras dosée au bout de 72 heures est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans l'huile d'olive initiale. Il ne se produit donc pas, dans ces conditions, une auto-hydrolyse des triglycérides. Par ailleurs, nous avons vérifié que la présence d'une quantité appréciable d'acides gras libres ne favorise pas l'auto-hydrolyse.

Extraction, séparation, estérification et dosage des A. G.

Après incubation de la préparation enzymatique, l'extraction quantitative des lipides n'est pas nécessaire en raison de l'incorporation, à ce stade, d'une quantité connue d'acide margarique qui servira d'étalon interne lors de la chromatographie en phase gazeuse (1). Il en résulte aussi que toutes les opérations ultérieures gagneront en simplicité et en rapidité d'exécution. Cet acide gras n'entre pas dans la composition de l'huile d'olive et peut être obtenu facilement à l'état pur ; de plus, il n'interfère avec aucun autre constituant séparé par chromatographie en phase gazeuse. Mis en œuvre pour la première fois par TINOCO et *al.* (1962), ce procédé a été utilisé par la suite par HAGENFELDT (1966), KHACHADURIAN et *al.* (1966), WEST et ROWBOTHAM (1967).

La technique de séparation des lipides sur couche mince d'acide silicique, en plus de sa rapidité, permet de se rendre compte, par examen visuel des chromatogrammes après leur révélation, de l'importance relative de la lipolyse dans différentes préparations et d'estimer les proportions des glycérides partiels formés. L'utilisation de B. H. T. pour éviter l'autoxydation de certains composés lipidiques lors de la chromatographie sur couche mince a été préconisée par WREN et SZCZEPANOWSKA (1964). Cet antioxygène est séparé au cours de la chromatographie (Rf = 0,85) mais par suite de sa présence dans le solvant de développement, il se trouve réparti sur toute la surface de la couche mince, évitant ainsi l'oxydation des acides insaturés au cours des manipulations.

La méthode d'estérification des A. G., peu souvent utilisée, apparaît avantageuse du point de vue sécurité d'emploi et rapidité d'exécution, lorsqu'elle est utilisée pour l'estérification de petites quantités d'A. G. Nous avons constaté qu'elle peut

(1) Nous avons vérifié que le rapport $[C_{17}] / [A. G.]$ libérés reste le même, que l'acide margarique soit ajouté avant ou après l'incubation. C'est pour des raisons pratiques que nous avons jugé préférable d'introduire l'étalon interne à ce stade.

être mise en œuvre pour des quantités bien inférieures à celles indiquées par SCHLENK et GELLERMAN. En effectuant l'estérification de quantités variables, soit d'un acide saturé (C_{16}), soit d'un acide insaturé ($C_{18::}$) en présence de margarate de méthyle

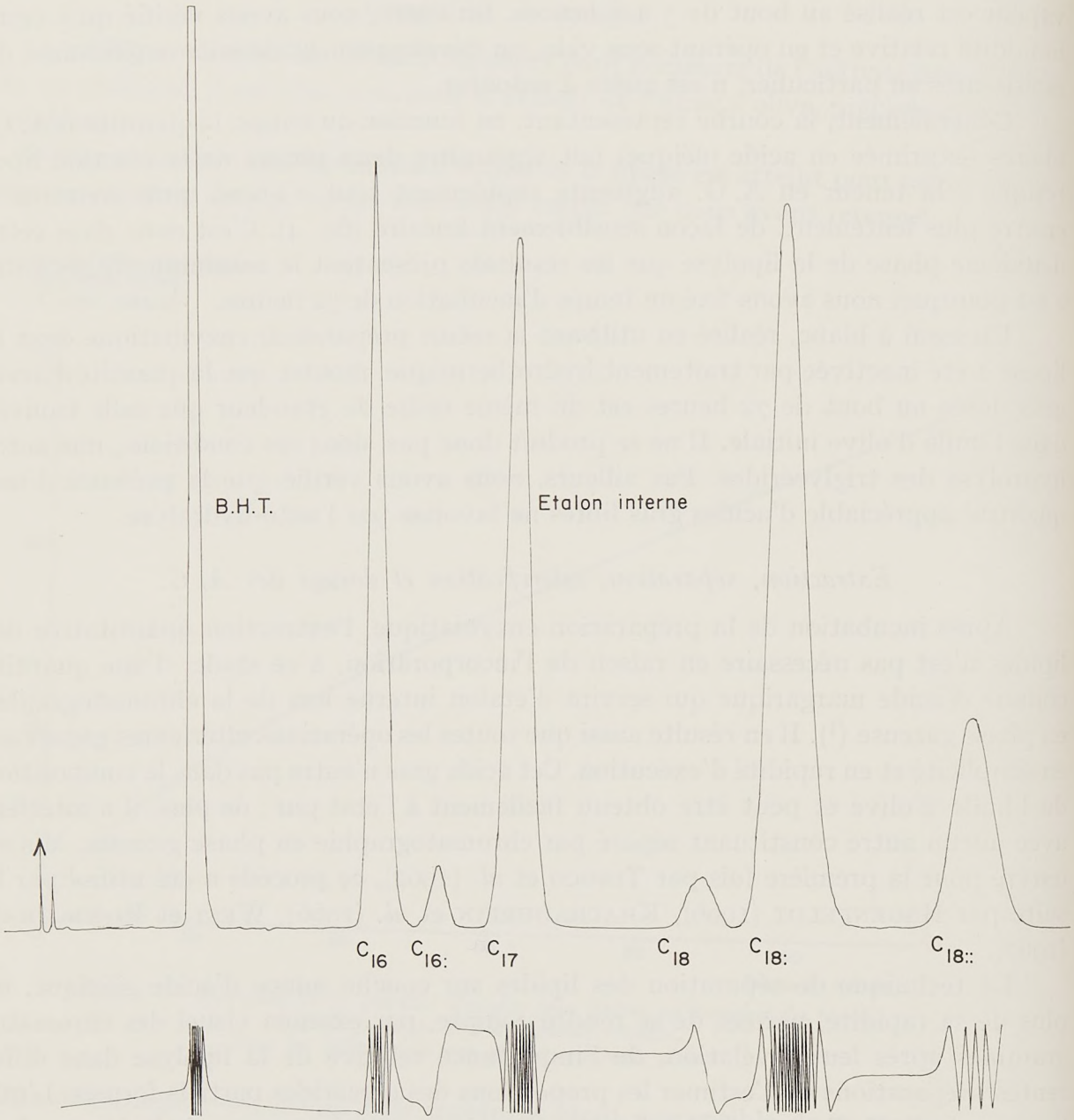


FIG. 5. — *Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras libérés au cours de la lipolyse, dans un mélange de son de blé et d'huile d'olive*

Gaz vecteur : N_2, débit : 25 ml/mn. Température four : 170°C. Vitesse de déroulement de l'enregistreur : 20 inches/h.

comme étalon interne, et en dosant les produits obtenus par chromatographie en phase gazeuse, nous avons pu constater que la masse minimum d'A. G. à mettre en œuvre est de l'ordre de 0,025 mg (1).

(1) Il est possible de détecter de façon précise la fin de la diazotation (ce qui évite le risque de réactions parasites) en plaçant le tube contenant la solution des A. G. dans un porte-cuve d'un spectrophotomètre, réglé à une longueur d'onde de 415 mμ, correspondant au maximum d'absorption du diazométhane en solution dans l'oxyde d'éthyle à 10 p. 100 de méthanol. La fin de la réaction est indiquée par une augmentation de densité optique due à la présence d'un excès de réactif.

Enfin le dosage des A. G. par chromatographie en phase gazeuse présente plusieurs avantages. En plus de sa sensibilité, cette technique permet de déterminer la nature et, en même temps, d'apprécier les proportions relatives des différents A. G., donc de suivre la cinétique de la réaction de lipolyse, d'étudier le mode d'action de l'enzyme et ainsi de différencier éventuellement les lipases. Nous avons représenté, dans la figure 5, le type de chromatogramme obtenu en utilisant un chromatographe Aerograph, type 204-IB, équipé d'une colonne (10", 1/8') remplie de Chromosorb W 60-80 AW imprégné de 10 p. 100 de succinate de diéthylène glycol et muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La résolution des pics est excellente, le B. H. T., de même que l'acide margarique, n'interfère avec aucun autre constituant.

CONCLUSION

Cette méthode de mesure de l'activité lipolytique se prête facilement à des déterminations en série, le temps passé du début de l'extraction des lipides jusqu'à l'obtention du résultat final n'excède pas 3 heures.

Certes, en raison de la faible hydratation du milieu de lipolyse, les résultats qu'elle fournit ne sont pas directement comparables à ceux de la méthode de Desnuelle, dans le cas où l'activité présente est suffisamment élevée pour que cette technique puisse s'appliquer. Il n'en reste pas moins que la méthode proposée est la seule qui, dans les milieux peu hydratés, permette de suivre l'évolution de la lipolyse dans des conditions très proches de celles existant dans la plupart des milieux naturels.

Reçu pour publication en décembre 1968.

SUMMARY

A METHOD FOR DETERMINING THE LIPOLYTIC ACTIVITY OF SOLID OR PASTY BIOLOGICAL PRODUCTS

A specific method for determining the lipolytic activity of solid or pasty biological products has been settled. Its principle is based on the quantitative analysis by gas chromatography of the fatty acids released in a mixture of the studied substance and olive oil placed under constant temperature and relative humidity.

After a certain time, lipids are extracted and fatty acids globally separated by thin layer chromatography, then successively eluated, esterified and determined by gas chromatography using the internal standard method. As this standard is put in after lipolysis as soon as lipids have been extracted, the quantitative recovery of fatty acids is not necessary and consequently all manipulations become easier and faster.

This method allows to determine the nature of the various fatty acids released, to appreciate their relative proportions and to study the lipolysis kinetics under conditions approximating to those existing in natural mediums with rather low hydration. Moreover, it may be easily adapted to series determinations.

ZUSAMMENFASSUNG

BESTIMMUNGSMETHODE DER LIPOLYTISCHEN AKTIVITÄT
IN FESTEN ODER TEIGFÖRMIGEN BIOLOGISCHEN PRODUKTEN

Es wurde eine specifische Methode zur Bestimmung der lipolytischen Aktivität in festen oder teigförmigen Produkten ausgearbeitet. Das Prinzip beruht auf der Gaschromatographischen Bestimmung der freigewordenen Fettsäuremenge in einem Gemisch der prüfenden Substanz und Olivenöl. Dieses Gemisch wird bei konstanter relativer Luftfeuchtigkeit und Temperatur gehalten.

Nach einer bestimmten Zeit werden die Lipide extrahiert und die gesamten Fettsäuren durch Dünnsichtchromatographie getrennt, dann nacheinander eluiert, esterifiziert und durch Gaschromatographie mit einem internen Standard bestimmt. Dieser Standard wird während der Lipidextraktion nach der Lipolyse zugegeben, damit ist die quantitative Rückgewinnung der Fettsäuren nicht mehr notwendig. Hieraus ergibt sich, dass alle Manipulationen einfacher und schneller sind. Diese Methode ermöglicht es, die Beschaffenheit verschiedener freigewordener Fettsäuren zu bestimmen, die Verhältnisse zu beurteilen und die Lipolysekinetik unter Bedingungen zu verfolgen, die denen in natürlichen wasserarmen Milieu herrschenden ähnlich sind.

Ausserdem eignet sich diese Methode gut zu reihenmässigen Bestimmungen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DESNUELLE P., CONSTANTIN M. J., BALDY J., 1955. Technique potentiométrique pour la mesure de l'activité de la lipase pancréatique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 285-290.

DRAPRON R., GUILBOT A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés : la dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 3, 175-218.

DRAPRON R., UZZAN A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **22**, B 383-436.

HAGENFELDT L., 1966. Gas chromatographic method for determination of individual free fatty acids in plasma. *Clin. chim. Acta*, **13**, 266-268.

KHACHADURIAN A. K., ADROUNI B., YACOUBIAN H., 1966. Metabolism of adipose tissue in the fat tail of the sheep *in vivo*. *J. Lipid Res.*, **7**, 427-436.

LUCHSINGER W. W., CUENDET L. S., BOYER P. D., GEDDES W. F., 1955. A sensitive method for measuring lipase activity and its application to wheat products. *Cereal Chem.*, **32**, 395-403.

ROTHE M., 1958. Eigenschaften und Reaktionsverhalten pflanzlicher Samenlipasen im natürlichen Milieu. I. Mitteilung-Aktivitätsbestimmung unter natürlichen Milieu Bedingungen. II. Mitteilung. Einfluss der Feuchtigkeit auf das Temperaturverhalten. *Ernährungsforschung*, **3**, 1, 21-51.

SARDA L., DESNUELLE P., 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513-521.

SCHLENK H., GELLERMAN J. L., 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Ann. Chem.*, **32**, 1414/1412.

TINOCO J., SHANNON A., MILJANICK P., LYMAN R. L., OKEY R., 1962. Analysis of fatty acid mixtures. Comparison of two absolute methods of determination. *Anal. Biochem.*, **3**, 514-518.

WEST C. E., ROWBOTHAM T. R., 1967. The use of a computer in the determination by gas-liquid chromatography of the concentration and identification of individual fatty acids present as free fatty acids, triglycerides and cholesteryl esters. *J. Chromatogr.*, **30**, 62-76.

WREN J. J., SZCZEPANOWSKA A. D., 1964. Chromatography of lipids in presence of an antioxydant 4-methyl-2, 6-di-tert.-butyl phenol. *J. Chromatogr.*, **14**, 405-410.

Ann. Technol. agric. 1969, **18** (1), 17-25.

MÉTHODE DE DISTINCTION RAPIDE DE QUELQUES VINS ROUGES DE CÉPAGES HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES PRODUCTEURS DIRECTS PAR EMPLOI DU RÉACTIF SULFOMERCURIQUE

M. FLANZY, et S. AUBERT

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'action du réactif sulfomercurique de SEMICHON-FLANZY (1926) a permis de révéler une tendance de nombreux vins d'hybrides, du type interspécifiques producteurs directs, à donner une coloration rouge persistante et un trouble singulier après cette défécation.

On a essayé de préciser ce phénomène caractéristique de précipitation secondaire afin de savoir s'il ne serait pas possible par cette voie de recherche de distinguer de façon relativement simple quelques vins rouges de *Vitis vinifera* et ceux d'hybrides parmi les plus courants.

INTRODUCTION

Dans un précédent mémoire (FLANZY et AUBERT, 1967), nous nous sommes penchés sur la possibilité de sélection des composés phénoliques des vins par défécation à l'aide des sels de métaux lourds. Plus particulièrement, on a montré qu'on peut, par cette voie, faire apparaître des différences entre vins de *Vitis vinifera* et vins d'hybrides rouges ou blancs.

On a poursuivi ces recherches dans le but de mettre au point une méthode de différenciation ou d'apporter quelques éléments nouveaux au problème de la distinction analytique de ces deux types de vins.

La précipitation des matières tannoïdes du vin avait été systématiquement étudiée par NÈGRE (1939, 1942, 1945) ; par l'emploi de l'acétate de zinc, il distinguait :

— d'une part « l'œnotanin » : ensemble de substances précipitées par l'action de l'acétate de zinc et oxydables par le permanganate de potassium,

— d'autre part, les « polyphénols non tanin », non précipitables par ce réactif.

LABORDE, 1908 (cité par NÈGRE, 1945) avait montré que le précipité principal obtenu avec un réactif à l'acétate mercurique donne un rapport : tanins pré-

cipités/oxyde mercurique fixé voisin de 1 ; mais ce rapport augmente avec le temps de contact du vin avec le réactif. Il ne s'agit donc pas d'une combinaison chimique exclusivement.

Plus récemment, BIOL et FOULONNEAU (1963) ont montré que le sulfate mercurique en milieu acide, appliqué selon la méthode de SÉMICHON-FLANZY (1926) a un pouvoir décolorant plus fort que le réactif à l'acétate de zinc ou à l'acétate de plomb ou de mercure (utilisés en milieu neutre, alcalin ou acide) ; les vins déféqués, et particulièrement ceux d'hybrides, sont imparfaitement décolorés par la seule précipitation.

Nous avons entrepris l'étude systématique de l'action du réactif au sulfate acide de mercure sur les constituants polyphénoliques des vins rouges avec les objectifs suivants :

1° dans un premier temps, connaître les effets de doses croissantes de réactif et déterminer, pour chaque vin la dose limite de réactif précipitant la quasitotalité des polyphénols ;

2° ensuite, nous assurer s'il était possible de distinguer ainsi différents types de polyphénols et rechercher la relation qui pourrait exister entre le phénomène caractéristique des hybrides rapporté précédemment (FLANZY et AUBERT, 1967) et un groupe de ces constituants ;

3° un but plus lointain est d'extrapoler, si possible, les résultats obtenus sur les vins rouges, les plus abordables à l'analyse, aux vins blancs qui présentent les mêmes observations sous l'action du réactif sulfomercurique.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Les objectifs que nous venons d'indiquer nous ont amenés à :

1° procéder à une succession de précipitations par des doses croissantes de réactif, dans des limites inférieures aux quantités généralement employées pour assurer une défécation totale ;

2° déterminer sur le liquide l'indice de permanganate avant et après chacune de ces défécations ; puis confronter les chiffres donnant l'élimination progressive des polyphénols, pour une série de vins rouges de variétés et d'origines diverses ;

3° rechercher dans le liquide déféqué les composés qui paraissent intervenir dans la formation du trouble caractéristique des hybrides.

A. — *Précipitation sélective des vins rouges par le réactif sulfomercurique*

La préparation du réactif, ainsi que les modalités pour faire apparaître le phénomène de trouble caractéristique, ont été rapportées dans une publication précédente (FLANZY et AUBERT, 1967).

Le même mode opératoire a été repris pour des ajouts de réactif croissants de 0,25 à 2,5 ml pour chaque nouvelle prise d'essai de 50 ml de vin. Cette prise d'essai est versée dans un ballon de 55 ml où on ajoute la quantité de réactif choisie ; puis, on ajuste avec de l'eau à 55 ml. Après avoir agité, on attend que le milieu évolue pendant 15 minutes à la température ambiante (15 à 25°C). Ensuite, on verse le tout dans un godet en verre de 100 ml, bouche, et centrifuge pendant 3 mn à 2 500 tours par minute (environ 750 *g*).

On obtient, d'une part, un liquide surnageant plus ou moins trouble ou limpide, c'est le vin déféqué, d'autre part, un dépôt comprenant en particulier les polyphénols précipités par le réactif.

L'indice de permanganate est effectué directement, par la méthode de RIBEREAU-GAYON et MAURIE (1942), sur une partie aliquote du vin déféqué de la même façon que sur le vin sans réactif.

Selon la richesse initiale du vin en polyphénols, nous avons effectué de 5 à 8 déterminations, pour des doses variables de réactif sulfomercurique dans les limites de 0,25 à 2,50 ml.

Afin d'avoir une meilleure précision dans la détermination des indices de permanganate, nos essais portent sur des vins rouges ayant une teneur moyenne en polyphénols (IMn de 17 à 50).

La série examinée comprend : 4 vins de *Vitis vinifera* (*Carignan, Morastel, Mourvèdre* et *Syrah*) et 4 vins d'hybrides interspécifiques (*Baco n° 1, S. V. 18315, Couderc 7120, S. 7053*) et deux autres vins du type teinturier provenant de cépages européens (*Alicante-Bouschet* et *Gamay-Fréau*).

B. — *Essais de séparation et identification du trouble caractéristique*

Nous avons essayé d'analyser et de différencier respectivement :

— d'une part, le dépôt principal après défécation sur deux échantillons de vins d'hybrides (*S. V. 18315*, 1963 et 1965) ; et, en parallèle, celui correspondant à un vin de *Vitis vinifera* (*Morastel* 1963).

— d'autre part, le dépôt secondaire correspondant au trouble caractéristique sur deux échantillons d'hybride.

On a repris les conditions opératoires précisées dans notre précédente publication (Flanzy et Aubert, 1967).

50 ml de vin sont déféqués avec 5 ml de réactif mercurique et le précipité principal — dépôt A — est isolé après 15 minutes de repos, par trois minutes de centrifugation à 2 500 tours/minutes (750 *g* environ).

Dans le cas du vin d'hybride, après 30 minutes à 1 heure de repos en flacon bouché, le liquide surnageant est soumis à une nouvelle centrifugation à 6 000 tours/minute (4 000 *g* environ) pendant 5 minutes. Une pellicule plus ou moins importante adhère au fond du tube, c'est le dépôt B. (On note que le liquide surnageant continue à se troubler très lentement par abandon à l'air.)

Il faut souligner que dans le cas du vin *S. V. 18315* (1965), échantillon donnant le trouble le plus important de tous les vins examinés, on obtient selon les essais, pour 50 ml de prise d'essai, de 10 à 40 mg de produit après lavage puis séchage à 80° pour le culot B ; soit 5 à 20 p. 100 de l'extrait sec obtenu sur le culot A du précipité principal.

La faible importance pondérale de l'insoluble qui apparaît n'a pas permis de faire, dans tous les cas de trouble, des analyses précises avec les moyens expérimentaux dont nous disposons.

Nous avons préalablement vérifié si le précipité obtenu n'était pas essentiellement constitué de composés mercuriques insolubilisés. Puis, à l'aide d'une technique de régénération des substances phénoliques déféquées, mise au point dans une autre publication (Flanzy et Aubert, 1968), nous avons essayé d'identifier les composés polyphénoliques qui peuvent intervenir plus particulièrement dans la formation du trouble caractéristique des hybrides.

Sur ces bases de travail, les deux culots A et B des trois échantillons expérimentés sont traités séparément et avant séchage de la façon suivante : après lavage à l'éthanol, puis à l'eau, les précipités sont mis en suspension dans une solution hydroalcoolique (50 eau-50 éthanol pur). Un barbotage d'hydrogène sulfuré dans le milieu décompose l'association précipitée en éliminant le mercure sous forme de sulfure noir insoluble.

Après filtration, on recueille une solution rouge. On la concentre dans un évaporateur rotatif Brewer-Houlier à température inférieure à 60° et sous le vide d'une trompe à eau.

Sur les concentrés obtenus on effectue une chromatographie sur papier Whatman n° 1 avec le mélange solvant : butanol-acide acétique pur-eau (4, 1, 5), très couramment utilisé pour identifier les composés phénoliques du vin.

Le dosage direct du mercure sur les culots A et B, séchés et dissous dans un mélange sulfonitrique, a été effectué par deux techniques volumétriques différentes (d'après : *Manuel d'Analyses* de G. Charlot et D. Bézier, 1955) ; elles ont pour principe la formation d'un iodate ou d'un thiocyanate de zinc et de mercure.

RÉSULTATS

Le tableau 1 rassemble les déterminations d'indices de permanganate après action de différentes doses de réactif sulfomercurique sur les vins classés par ordre de richesse croissante en polyphénols. On observe un changement complet de cette hiérarchie dès la défécation par une très faible quantité de réactif (0,25 ml pour 50 ml de vin). De façon très générale, les indices de permanganate résiduaires des vins d'hybrides déféqués sont relativement plus élevés que ceux des *Vitis vinifera*. On a confronté cette particularité avec le test du trouble caractéristique précédemment mis au point (Flanzy et Aubert, 1967).

Le tableau 2 rapporte trois exemples d'évaluation du mercure dans les culots de centrifugation après défécation (précipité principal et trouble isolé après une deuxième centrifugation).

TABLEAU I

Type	Cépage	Origine	Année	IMn initial	Indice de permanganate sur le vin déféqué. (Réactif mercurique ajouté pour chaque prise de 50 ml de vin)								Test du trouble caractéristique
				0	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,00	2,50	
V. v.	*Carignan*	Narbonne	1967	17	5,5	3,0	1,0	0,5	1,0			1,0	limpide
V. v.	*Morastel*	Narbonne	1963	25	9,0	4,0	2,0	1,0	0		(— 0,5)	(— 0,5)	limpide
H	*Baco n° 1*	Blois	1965	27	11,5	8,5	5,5	2,5	1,5		1,0	0,5	trouble
V. v.	*Mourvèdre*	Narbonne	1967	28	10,0	5,5	2,0	1,5	—	1,0	—	—	limpide
H	*S. V. 18315*	Narbonne	1963	30	16,0	14,0	9,0	6,5	4,5	4,5	4,0	3,5	très trouble
H	*Couderc 7120*	Toulouse	1965	36	9,0	4,5	3,5	5,0	—	1,0	—	0	limpide
H	*S. 7053*	Narbonne	1963	41	30,0	19,0	12,5	6,0	—	1,0	—	—	trouble
V. v.	*Syrah*	Narbonne	1967	42	12,5	4,0	2,0	2,0	—	2,0	—	—	limpide
V. v.	*Alicante-Bouschet*	Toulouse	1965	44	9,0	4,0	2,5	1,0	—	—	1,0	—	douteux
V. v.	*Gamay-Fréau*	Toulouse	1965	50	16,0	11,5	7,5	4,0	—	2,0	1,0	0,5	limpide

V. v. = *Vitis vinifera.*
H = Hybrides.

TABLEAU 2

Cépage Indice de permanganate	Vin Origine	Année	Dépôts	Extrait sec pour 50 ml (mg)	Mercure (Hg^{++}) (mg)	$\frac{E.S. - OHg}{OHg}$
Seyve-Villard 18315 IMn = 26	Pech-Rouge Narbonne (11)	1965	(A) 2 500 tr/mn	270	118	1,12
			(B) trouble 6 000 tr/mn	32	15	0,98
Seyve-Villard 18315 IMn = 30	Pech-Rouge Narbonne (11)	1963	(A)	220	83	1,46
			(B)	26	9,5	1,53
Morastel IMn = 25	Pech-Rouge Narbonne (11)	1963	(A)	480	178	1,50
			(B)	traces	—	—

DISCUSSION

A. — *Action sélective du réactif sulfomercurique*

La précipitation progressive de l'ensemble des substances polyphénoliques (tabl. 1) permet de noter les constatations générales suivantes, valables pour la série de vins considérée :

1° Pour les vins de *Vitis vinifera*, la courbe de précipitation est asymptote de l'axe des abscisses dès la dose de 1 ml de réactif.

Pour les vins d'hybrides, il faut atteindre des doses plus élevées pour que les indices de permanganate se stabilisent.

2° Si l'on considère le rapport de l'indice IMn_1, après défécation avec 1 ml de réactif, avec l'indice du vin initial IMn_0 :

— les vins de *Vitis vinifera* varient entre 0,0228 et 0,080,

— les vins d'hybrides donnent un rapport entre 0,0925 et 0,216.

Plus schématiquement, on peut admettre que le rapport $\frac{IMn_1 \times 10}{IMn_0}$ est pour :

— les vins de *Vitis vinifera*, toujours inférieur à 1,

— les vins d'hybrides, toujours supérieur à 1.

3° Si l'on défèque chaque vin étudié avec une quantité de réactif adaptée à la richesse initiale de ce vin en polyphénols, dose calculée à l'aide de la formule approximative suivante : $IMn_0 \times 0{,}03$, en extrapolant les données du tableau 2, nous trouverions :

— les vins de *Vitis vinifera* ont un indice de permanganate résiduaire toujours inférieur à 3 ;

— les vins d'hybrides ont des valeurs toujours supérieures à 3.

Toutes ces observations confirment que les vins d'hybrides sont particulièrement réfractaires à la précipitation.

Ces résultats permettent d'envisager pour la sélection des vins d'hybrides une méthode rapide décrite ci-dessous.

B. — *Méthode indicative de sélection des vins rouges d'hybrides*

50 ml de vin sont déféqués avec 1 ml de réactif sulfomercurique, puis on centrifuge ou filtre. Si le liquide est nettement rouge avec un indice de permanganate supérieur à 1, on peut soupçonner la présence d'hybride rouge. Si le liquide est peu coloré et d'indice de permanganate voisin du témoin, on a statistiquement de fortes chances d'avoir essentiellement un vin de *Vitis vinifera*.

Mais, il est bien évident que pour avoir une meilleure certitude sur la présence d'hybrides, il faut recourir aux méthodes classiques déjà signalées (Ribéreau-Gayon, Dorier et Vérelle, Bourzeix cités dans Flanzy et Aubert, 1967).

Ce nouveau test de sélection des vins d'hybrides a pour principal intérêt pratique son utilisation aisée par les laboratoires particuliers ne disposant que d'un équipement très sommaire d'analyse.

C. — *Relations avec le trouble caractéristique des hybrides*

Il n'apparaît pas de relation entre l'intensité du trouble et les indices de permanganate des défécations progressives. Toutefois, il faut souligner que les quantités de réactif mercurique utilisées sont nettement différentes dans ces deux conditions d'examen des vins déféqués.

Initialement, nous avions utilisé un net excès de réactif (5 ml pour 50 ml de vin) en vue de généraliser notre test de différenciation des vins d'hybrides de ceux de *Vitis vinifera*. Dans le cas présent, la « défécation limitée » permet de diminuer un phénomène de redissolution partielle du précipité dans le milieu plus acide créé par le réactif sulfomercurique. On voit que les conditions idéales de sélection des polyphénols seront différentes pour chaque vin et difficiles à mettre en formule. Ce phénomène de précipitation singulier, sur l'ensemble des polyphénols, ne peut constituer un critère sûr d'identification d'un vin d'hybride dans un mélange, mais offre un nouveau moyen de présomption très rapide.

Les deux tests de distinction des hybrides proposés peuvent se compléter. Ainsi, certaines anomalies à l'égard de la première technique expérimentée peuvent être levées. Le cas du vin de teinturier *Alicante-Bouschet*, qui donne un trouble douteux, laissant supposer la présence d'hybride, est nettement écarté par défécation rapide avec 1 ml de réactif. A l'opposé, le vin de *Couderc 7120*, qui ne donne pas de trouble caractéristique, est difficile à décolorer malgré un indice de permanganate faible.

D. — *Essais d'isolement et d'analyse du trouble caractéristique des vins d'hybrides*

Le tableau 2 fait apparaître que la fraction correspondant au trouble isolé est faible. La part du mercure dans l'insoluble récupéré — dépôt B — est importante et variable pour deux échantillons de même origine (0,98 et 1,53).

La différence entre les rapports : partie organique/oxyde mercurique fixé pour les deux dépôts A du *Morastel* et *S. V. 18513* de l'année 1963 n'est pas significative (1,46 et 1,50) ; et, au contraire, plus sensible entre les deux échantillons d'hybride (1,12 et 1,46).

Dans les dépôts B, on retrouve le même rapport : partie organique/oxyde mercurique fixé très voisin des précipités principaux (A).

Les variations de ce rapport, pour les dépôts A ou B, sont plus liées aux conditions de l'année qu'à une sélection faite par le réactif sulfomercurique parmi les polyphénols de deux vins issus de cépages différents.

On note que l'extrait sec des précipités n'est pas proportionnel aux indices de permanganate des vins ; ceci laisse supposer une composition très variable de la partie organique où les polyphénols ne représentent qu'une fraction, à côté de composés pectiques probablement.

L'identification chromatographique n'a pas apporté plus de clarté dans l'analyse du trouble.

Le chromatogramme correspondant au dépôt B ne donne pas de séparation convenable permettant d'identifier un anthocyane particulier. On observe des traînées rouges, mais la fluorescence rose brique de la malvine apparaît mal ou est masquée par des corps fluorescents en vert, jaune ou bleu, sous forme de taches indistinctes (vraisemblablement des acides phénols). De plus, ainsi que nous l'avons rapporté dans un autre article (Flanzy et Aubert, 1968) traitant plus spécialement du mode d'isolement des polyphénols du vin, il est difficile de préciser la part respective des composés phénoliques initiaux et de ceux qui pourraient provenir de transformation au cours de ce traitement.

Nous retiendrons qu'une petite fraction des anthocyanes n'est pas directement déféquée, mais le trouble caractéristique n'apparaît pas en relation directe avec la richesse initiale en malvoside.

Par contre, nous avons pu mettre en évidence la présence constante et appréciable de composés du type leucoanthocyanes ou proanthocyanes (éléments flavane 3-4 diol) dans les matières polyphénoliques régénérées des précipités ; ceci sur les dépôts A et B des vins de *S. V. 18315*, comme sur le dépôt A d'un vin de *Vitis vinifera*.

Nous avons pu les évaluer en utilisant la technique de Masquelier et *al.*, 1959, à 5-10 p. 100 environ des leucoanthocyanes totaux dans le cas accentué du vin de *S. V. 18315*, déféqué avec 2 à 5 ml de réactif pour 50 ml de vin.

Nous ne discuterons pas ici des proportions respectives en colorants et leucoanthocyanes non précipités par le réactif sulfomercurique dans les quelques cas chiffrés. Il semble toutefois que ce phénomène soit général et on retrouve des leucoanthocyanes dans divers vins rouges, et quelques vins blancs, après défécation. Les vins d'hybrides seraient-ils particulièrement riches en certaines formes de leucoanthocyanes responsables de la défécation difficile et du trouble caractéristique ?

Il faut signaler, sur un autre plan analytique, la possibilité de défécation quasi totale des vins rouges ou blancs, en vue du dosage des sucres, en appliquant strictement les conditions opératoires données par Sémichon-Flanzy (1926). En effet, les polyphénols non floculés directement par le réactif sulfomercurique acide sont néanmoins éliminés lorsqu'on procède à la deuxième phase de la défécation (élimination du mercure en excès par SH_2). Le complexe sulfate-sulfure mercurique formé, à l'état colloïdal, est doué d'un fort pouvoir absorbant et retient les polyphénols qui passent après la première filtration du défécat.

Reçu pour publication en février 1969.

CONCLUSION

L'action sélective du réactif mercurique de SEMICHON-FLANZY sur les matières tannoïdes du vin montre une tendance des vins d'hybrides rouges à être déféqués plus difficilement que les *Vitis vinifera*.

Une méthode de différenciation rapide des vins rouges d'hybrides est proposée, avec pour base le comportement particulier des vins d'hybrides sous l'action d'une quantité choisie de réactif sulfomercurique.

La séparation et l'analyse du précipité secondaire qui donne le trouble caractéristique, montre qu'il s'agit d'un phénomène d'insolubilisation du mercure entrainant plus particulièrement des composés leucoanthocyaniques à côté d'autres polyphénols plus difficiles à identifier avec précision.

SUMMARY

A QUICK METHOD OF DISTINGUISHING SOME RED WINES FROM INTERSPECIFIC DIRECT-PRODUCER HYBRIDS BY MEANS OF A SULPHO-MERCURIC REAGENT

The selective action of the mercuric SÉMICHON-FLANZY reagent on the tannic substances in wine tends to make red wine from hybrid grapes more difficult to clarify than wines from *Vitis vinifera*.

A quick method of distinguishing wines from hybrids is suggested, using the behaviour of wines from hybrids when subjected to the action of a given quantity of the sulpho-mercuric reagent.

The separation and analysis of the secondary precipitate derived from the characteristic clouding shows it to be due to the mercury being rendered insoluble, carrying with it, in particular, leucoanthocyanic compounds together with other polyphenols more difficult to identify with accuracy.

RESUMEN

MÉTODO RÁPIDO PARA LA DISTINCION DE ALGUNOS VINOS TINTOS DE CEPAS HÍBRIDAS INTERESPECÍFICAS PRODUCTORAS DIRECTAS POR EL EMPLEO DEL REACTIVO SULFOMERCÚRICO

La acción selectiva del reactivo mercúrico de SÉMICHON-FLANZY sobre las materias tanoides del vino, pone de manifiesto una tendencia de los vinos tintos de híbridas a quedar defecados más dificilmente que los vinos de *Vitis vinifera*.

Se propone un método rápido para establecer la diferencia de los vinos tintos de híbridas, tomando como base el comportamiento particular de los vinos de híbridas bajo la acción de una cantidad determinada de reactivo sulfomercúrico.

La separación y el análisis del precipitado secundario que proporciona la turbiedad característica, demuestra que se trata de un fenómeno de insolubilización del mercurio, que arrastra en particular diversos compuestos leucoantociánicos al lado de otros polifenoles más dificiles de identificar con precisión.

RIASSUNTO

METODO DI DISTINZIONE RAPIDA DI ALCUNI VINI ROSSI DI CEPPI IBRIDI INTERSPECIFICI PRODUTTORI DIRETTI, CON L'IMPIEGO DEL REATTIVO SULFOMERCURICO

L'azione selettiva del reattivo mercurico di SÉMICHON-FLANZY sulle materie tannoidi del vino mostra una tendenza dei vini di ibridi rossi a essere defecati più difficilmente dei *Vitis vinifera*.

Un metodo di differenziazione rapida dei vini rossi di ibridi si è proposto, avente per base il comportamento particolare dei vini di ibridi sotto l'azione d'una quantitá scelta di reattivo sulfomercurico.

La separazione e l'analisi del precipitato secondario che dà la torbidezza caratteristica, mostra che si tratta d'un fenomeno d'insolubilizzazione del mercurio che trascina più particolarmente dei composti leucoantocianici a lato di altri polifenoli più difficili a identificare con precisione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIOL H., FOULONNEAU Ch., 1963. Décoloration des vins rouges par certains sels de métaux lourds. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 27-38.

BOURZEIX M., 1967. L'isolement et le dosage de faibles quantités d'anthocyanes diglucosides dans les vins et les jus de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **16**, n° 4, 357-364.

CHARLOT G., BÉZIER D., 1955. *Analyse quantitative minérale*, 3e éd., 580-585 Masson et Cie, Paris, 6e.

FLANZY M., AUBERT S., 1967. Observations sur la défécation des vins de *Vitis vinifera* et d'hybrides. Essai d'identification des vins d'hybrides blancs. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 241-250.

FLANZY M., AUBERT S., 1968. Méthode de purification de l'ensemble des composés phénoliques du vin (note de laboratoire). *Ann. Technol. agric.*, **17** (1), 93-98.

MASQUELIER J., VITTE G., ORTEGA M., 1959. Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **98**, 145-148.

NÈGRE E., 1939. Comment distinguer les vins rosés et les vins de café des vins rouges? *C. R. Acad. Agric.*, **18**, 640. *Ann. Falsif. Fraudes*, **32**, 175.

NÈGRE E., 1942. Les matières tannoïdes et la composition des vins. *Bull. offic. internation. Vigne Vin*, 22-52.

NÈGRE E., 1945. *Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin.* Thèse, Strasbourg.

SEMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Falsif. Fraudes*, **19**, 208-226.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (1), 27-44.

ÉVALUATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES VINS BLANCS

Étude comparée de quelques vins de « Vitis vinifera » et de cépages hybrides interspécifiques producteurs directs

M. FLANZY et S. AUBERT

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les travaux sur la confrontation de plusieurs indices d'évaluation des composés phénoliques des vins blancs de cépages variés sont rares.

Nous avons essayé de combler, en partie, cette lacune et recherché si les corrélations possibles entre différents indices étaient susceptibles de faire apparaître des caractères analytiques distinctifs entre les vins blancs issus de *Vitis vinifera* et ceux de quelques cépages hybrides interspécifiques producteurs directs.

INTRODUCTION

Dans deux mémoires précédents (Flanzy, Aubert, 1967, 1968 *a*), nous avons montré que de nombreux vins, rouges ou blancs, issus de cépages classés parmi les hybrides interspécifiques producteurs directs, présentent quelques particularités analytiques et, en particulier, un phénomène de trouble caractéristique par défécation au moyen du réactif sulfomercurique de Sémichon-Flanzy. L'étude des substances responsables de cette particularité fait apparaître la participation de composés polyphénoliques et plus particulièrement de composés du type leucoanthocyanes, mais dans des limites qui restent à préciser.

Une possibilité de distinction analytique de quelques vins blancs de cépages « hybrides » réglementés de ceux de *Vitis vinifera*, a été entrevue dans cette voie de recherche. Ceci pose tout d'abord le problème de l'évaluation, si possible spécifique, des teneurs en divers composés polyphénoliques des vins blancs.

Dans les ouvrages classiques d'analyse des vins (P. JAULMES, 1951, J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD, 1958), on ne relève aucune méthode vraiment satisfaisante pour effectuer le dosage des composés polyphénoliques lorsque les teneurs en polyphénols sont relativement faibles (moins de 100 mg par litre).

Dans le cas des vins blancs, on se limite souvent à une évaluation colorimétrique en utilisant la réaction avec le chlorure ferrique en milieu alcalin. Par cette méthode et pour la région bordelaise, on trouve de 0 à 500 mg de tanins par litre (exprimés en acide tannique), avec une moyenne de 50 à 100 mg selon l'âge et les conditions de logement des vins blancs. Cette technique s'avère trop imprécise.

Les auteurs italiens ont proposé de doser les tanins par leur absorption caractéristique en ultraviolet à 275-280 nm (G. MARCHERI, 1960).

O. COLAGRANDE (1961) trouve dans le cas des vins blancs de 380 à 1 100 mg/litre de tanin (exprimé en tanins du thé) après extraction de ceux-ci par l'acétate d'éthyle et dosage spectrophotométrique UV à 280 nm. La principale réserve à faire sur cette méthode est que ce pic, traduisant certains groupes chromophores et particulièrement les noyaux phénoliques, n'est pas toujours bien détaché et souvent décalé. Il est difficile de faire la part des absorptions parasites dans cette zone UV encombrée.

Toutefois, le profil des courbes entre 250 et 340 nm a permis à BERG (1952) de classer arbitrairement une vingtaine de vins blancs de *Vitis vinifera* en cinq classes distinctes et en fonction de leur aptitude au brunissement par chauffage.

La méthode adoptée par l'*Association Official of Agricultural Chemists*, pour les vins et whiskies, repose sur la réduction du réactif de Denis-Folin par les polyphénols. Son principal avantage est une bonne sensibilité, mais sa sélectivité est réduite aux fonctions phénoliques.

La technique de MICHAUD (1966), sur le dosage colorimétrique des polyphénols réducteurs à l'aide d'un réactif au ferricyanure ferrique, permettrait de préciser la position de certains groupements hydroxyles, et constitue un progrès sur la technique précédente (reproductibilité des mesures particulièrement bonne). Mais, l'utilisation de la spécificité de certaines structures, comme la substitution en 3 des flavonoïdes, demande une mise au point délicate.

La mesure de l'indice de permanganate, commode dans le cas des vins rouges, ne peut s'appliquer que pour les vins blancs de macération ; rappelons qu'un IMn de 5 représente environ 200 mg de tanin. Cet indice permet de rendre compte assez fidèlement des propriétés organoleptiques ou physico-chimiques des vins rouges. Son mode d'action n'est pas bien précisé, mais BATE-SMITH (1954) a montré que le permanganate agit de façon préférentielle sur les ortho- et para-diphénols (rapporté par RIBÉREAU-GAYON et NEDELTCHEV, 1965).

Il serait donc souhaitable d'avoir un indice semblable à ce dernier et suffisamment sensible pour être applicable aux vins blancs. Nous avons pensé au réactif d'ARNOW (1937) expérimenté sur le dosage des teneurs en 3,4 dihydroxyphénylalanine et utilisé également dans l'évaluation des acides caféiques ou chlorogéniques (NICHIFORESCO et COUCOU, 1965). Cette méthode a pour bases une réaction de nitrosation et la formation d'un complexe avec le molybdate de sodium. On obtient une coloration rouge spécifique des ortho-diphénols (noyaux pyrocatéchol), d'après JOHNSON et SCHAAL (1957) ; les vérifications que nous avons faites confirment cette spécificité sur quelques flavonoïdes et acides-phénols courants dans les vins.

Les dosages des tanins leucoanthocyaniques ou catéchiques des vins rouges proposés par RIBÉREAU-GAYON (1957, 1964, 1965 et 1966) sont beaucoup plus délicats dans l'application aux vins blancs. Ces derniers, ne provenant pas d'une macération des parties solides avec le jus, sont beaucoup moins riches en polyphénols. De plus, le chauffage en milieu acide donne des colorations brunes, en particulier par les combinaisons sucres-protéines (du type mélanoïdines). Ces réactions parasites rendent aléatoire le dosage direct des composés du type leucoanthocyanes dans le cas des vins blancs, où la formation de cyanidol est relativement faible.

Par des extractions sélectives, MASQUELIER et POINT (1955) distinguent dans les vins blancs secs deux fractions de composés polyphénoliques : d'une part, des pigments flavoniques (50 à 300 mg par litre exprimés en aglucones) et, d'autre part, des leucoanthocyanes (10 à 50 mg pour les vins non liquoreux).

Plus récemment, MASQUELIER (1963) a mis au point une méthode de dosage spécifique des composés leucoanthocyaniques des vins blancs. Pour éliminer les artefacts, il passe par une absorption préalable des leucoanthocyanes sur poudre de polyamide (Divergan B. A. S. F.). Il trouve de 40 à 93 mg de leucoanthocyanes par litre et seulement des traces dans le cas des vendanges botrytisées. La fixation sur cette poudre de nylon est quasi-totale. Toutefois, pour un polyamide ou une résine de polyvinylpyrolidone quelconque, il semble qu'il y ait des absorptions préférentielles des leucoanthocyanes et catéchines plus ou moins condensées (SINGLETON, 1967).

Ne disposant que d'une poudre de nylon dont le pouvoir absorbant était indéterminé, nous avons préféré une technique plus personnelle qui a pour base la précipitation des leucoanthocyanes par le réactif sulfomercurique. Cet agent de défécation permet d'isoler les polyphénols en éliminant les substances susceptibles de fausser le dosage des composés leucoanthocyaniques (FLANZY et AUBERT, 1968). Quelques essais nous ont montré que cette méthode peut donner des résultats confrontables à la fixation sur poudre de polyamide. De plus, le rapprochement avec le test du trouble caractéristique des hybrides (FLANZY, AUBERT, 1969) par défécation mercurique est évident, car les deux phénomènes sont complémentaires.

Nous avons confronté cette technique avec une nouvelle méthode d'évaluation spectrophotométrique, par mesure directe en ultraviolet, des tanins du type leucocyanidol proposée tout récemment par PUISAIS et *al.* (1968).

Parmi les méthodes mises au point pour le dosage des composés phénoliques des vins rouges, RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966) ont montré que la réaction avec la vanilline permet de faire une sélection parmi les tanins, condensés ou non ; plus spécialement des composés leucoanthocyaniques ou catéchiques qui possèdent un noyau phloroglucinol non associé sur les positions 6 ou 8 du cycle A des flavanes.

PERI (1967) étudiant l'évolution des polyphénols au cours de la maturation des raisins blancs a utilisé la plupart des méthodes proposées précédemment.

Cet auteur met en relief l'influence du cépage, de la maturité et de la région de culture sur la teneur du raisin en polyphénols. Nous avancerons que ces facteurs interviennent aussi pour les vins blancs ; mais il n'est pas évident que la nature des cépages prédomine dans la transposition des polyphénols.

La confrontation de plusieurs indices spécifiques de différentes structures de composés phénoliques pourrait-elle fournir une voie d'accès à la distinction analytique quantitative et peut être qualitative de quelques vins blancs issus de cépages

hybrides de ceux de *Vitis vinifera* parmi les plus communs ? Précisons bien que cette recherche n'est qu'un travail d'approche et non la mise au point d'un procédé permettant de différencier de façon sûre tous les cépages européens de ceux d'hybrides interspécifiques producteurs directs inventoriés et plus ou moins répandus dans les vignobles français.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Les vins blancs étudiés sont de provenances diverses et de cépages authentiques. On a été amené à distinguer deux origines principales dont les conditions écologiques sont différentes.

1. *Vins du Midi méditerranéen* (Languedoc)

Tous les échantillons proviennent de microvinifications effectuées à :

a) Narbonne : Station centrale de Technologie des Produits végétaux, vendange du Domaine de Pech-Rouge à Gruissan (Aude) ;

b) Montpellier : École nationale supérieure d'Agronomie, vendange du Domaine de Vassal à Marseillan (Hérault) ;

c) Lézignan : Conseil interprofessionnel des vins des Corbières et du Minervois (Aude).

2. *Vins de la vallée de la Loire* (régions septentrionales).

Ces échantillons sont, pour la plupart, des vins obtenus au niveau industriel et nous ont été fournis par :

a) Tours : Laboratoire départemental d'Analyses (Indre-et-Loire) ;

b) Blois : Station agronomique et œnologique (Loir-et-Cher) ;

c) Cours-les-Cosnes : Station expérimentale œnologique I. N. R. A. (Nièvre).

Ces recherches portent sur deux séries d'échantillons correspondant aux mesures effectuées, d'une part, en 1966-1967 et, d'autre part, en 1967-1968. Entre ces deux séries d'essais, les vins examinés sont différents et le matériel d'analyse et les techniques ont pu être améliorés. En particulier, seule la deuxième série a fait l'objet d'une évaluation des leucoanthocyanes. Ainsi, les confrontations entre *Vitis vinifera* et hybrides se font à l'intérieur d'une même série.

A partir des méthodes inventoriées dans l'introduction, nous avons adapté ou mis au point plusieurs indices d'évaluation des composés phénoliques des vins blancs. On a déterminé ainsi : les spectres d'absorption des vins dans le visible et l'ultraviolet, les polyphénols totaux réducteurs, les orthodiphénols, les leucoanthocyanes et les tanins peu condensés ; enfin, le trouble mercurique caractéristique de certains hybrides selon le protocole mis au point dans un article précédent (FLANZY et AUBERT, 1967).

De plus, pour appuyer notre discussion, nous avons été amenés à effectuer les analyses courantes (degré alcoolique, acidité, SO_2 et sucres résiduaires) des vins de la série 2.

a) *Mesures colorimétriques et spectres d'absorption.*

On a utilisé :

— Série 1 : Un spectrophotomètre Jobin et Yvon, modèle Algérie, à prisme et monofaisceau, cuves en quartz de 10 mm.

— Série 2 : Un spectrophotomètre Beckman, modèle DBG, à réseau et double faisceau, muni d'un enregistreur 10 pouces.

La couleur des vins blancs est exprimée par la densité optique à 425 nm, sans dilution, sur 10 mm, selon l'indice préconisé par BERG (1953).

Les spectres en ultraviolet des vins blancs ont été pris après dilution dans les solvants suivants :

— Série 1 : Solvant : Éthanol pur-eau distillée (50-50 en volumes) ;

— Série 2 : 1er solvant : Eau distillée ;
2e solvant : Milieu artificiel modèle du vin.
(Éthanol 10 p. 100 en volume + mélange acide tartrique et bitartrate de potassium pour obtenir un pH de 3,2).

b) *Polyphénols totaux par la méthode au réactif de* DENIS-FOLIN.

Dans un ballon de 100 ml contenant 75 ml d'eau, on ajoute 1 ou 2 ml de vin blanc, puis 5 ml de réactif phosphomolybdo-tungstique (préparé selon la technique donnée par PRO, 1952) ; on ajoute ensuite 10 ml d'une solution saturée de carbonate neutre de sodium cristallisé (350 g/litre), puis on complète à 100 ml avec de l'eau. On laisse la teinte bleue évoluer pendant 30 minutes, puis on mesure l'absorption à 760 nm. Le témoin à blanc est effectué en remplaçant le vin par de l'eau. Un étalonnage a été fait sur de la catéchine (+) (marque Fluka, qualité « puriss »).

Les mesures faites pour une D.O. comprise entre 0,100 et 0,600 donnent sensiblement une droite (extinction ou D.O. (760 nm) = 0,380 pour 0,5 mg de catéchine (+) dans 100 ml de solution).

c) *Ortho-dihydroxyphénols par le réactif d'*ARNOW.

Le réactif d'ARNOW est préparé en mélangeant 10 g de nitrite de sodium avec 10 g de molybdate de sodium dans 100 ml d'eau distillée.

Dans un ballon de 50 ml, on introduit successivement : 5 ml d'eau, 2 ml de vin blanc, 5 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N, puis, en agitant, 5 ml de réactif d'ARNOW et, une minute après, 5 ml de soude normale ; on complète à 50 ml avec de l'eau. Pour chaque vin, on effectue un témoin en remplaçant le réactif par de l'eau.

Le témoin est jaune à vert clair et le vin avec le réactif rouge à rouge orangé. On mesure, sans attendre, l'absorption à 500 nm.

L'étalonnage de la méthode a été fait sur de la catéchine (+) ; en opérant sur des prises de 0,1 à 0,8 mg pour 50 ml de solution, on obtient sensiblement une droite (D.O. (500 nm) = 0,260 pour 0,5 mg de catéchine pour 50 ml de solution).

d) *Dosage des tanins peu condensés par réaction avec la vanilline.*

Le mode opératoire a été décrit par P. RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1960), dans le cas des vins rouges.

Dans le cas des vins blancs, on opère sur une prise de 1 ml à 4 ml de vin non dilué ou après dilution au 1/5 dans de l'eau. L'étalonnage est fait également sur de la catéchine (+) (D.O. (500 nm) = 0,480 pour 0,05 mg de catéchine (+) pour 10 ml de solution).

e) *Évaluation des leucoanthocyanes déféqués.*

Dans un godet de centrifugation de 30 ml en verre, on précipite 10 ml de vin blanc par 0,4 ml de réactif sulfomercurique (préparation donnée dans FLANZY et AUBERT, 1967).

On élimine le liquide surnageant après centrifugation à 5 000 tours/minute (3 500 *g* environ) à température ambiante (20°C).

Le culot est lavé par 20 ml de mélange : éthanol-eau (50-50) et on élimine les eaux de lavage après décantation centrifuge.

Le précipité de polyphénols est redissous dans 20 ml de mélange butanol-acide chlorhydrique pur (60-40 en volumes) et on centrifuge pour séparer les particules insolubles.

On mesure la densité optique à 550 nm de la solution avant et après chauffage à 100°C pendant 30 minutes ; on dilue éventuellement dans le solvant butanolique précédent.

La présence de mercure dans le milieu ne perturbe pas sensiblement la transformation des composés leucoanthocyaniques en cyanidol rouge (cette technique a fait l'objet d'une mise au point qui sera publiée ultérieurement).

La teneur en leucoanthocyanes précipités est exprimée selon la formule conventionnelle donnée par LEBRETON et *al.* (1967) : teneur en leucocyanidine en mg par g d'un extrait végétal :

$$5{,}2 \cdot 10^{-2} \times \text{D.O. (550)} \times \frac{\text{Volume solution} \times \text{dilution}}{\text{Poids prise d'essai en grammes}}$$

Après adaptation au cas des vins blancs, selon notre technique, on aura dans les conditions décrites précédemment : teneur en leucocyanidine en g par litre de vin blanc :

$$104 \times \text{différence D.O. (550) (entre } 30^{\circ} \text{ et } 100^{\circ})$$

RÉSULTATS

Ils sont inscrits dans les tableaux 1 à 5.

Les figures 1 et 2 permettent de confronter, d'une part les indices de polyphénols d'autre part les profils des courbes d'absorption en UV des vins de *Vitis vinifera* et d'hybrides. Nous n'avons pas jugé utile de rapporter toutes les corrélations possibles entre ces différentes données, seules les plus représentatives seront signalées.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Si on analyse isolément chaque indice de composés polyphénoliques des deux variétés de vins blancs, on fait les observations suivantes.

A. — *Couleur et indice de tannoïdes totaux* (tabl. 1 et 3)

Il est curieux de constater que, dans la série 2, les hybrides ont en moyenne des indices de coloration jaune (D.O. 425) du même ordre que les vins de *Vitis vinifera* ; par contre, dans la série 1, ces derniers sont nettement moins colorés. L'aptitude particulière des vins d'hybrides à madériser apparaîtrait-elle après un temps de conservation plus long ou en fonction des conditions annuelles ?

Toutefois, dans les deux séries, les hybrides sont généralement plus riches en matières tannoïdes totales (chromophores benzéniques avec D.O. à 265 nm), sans pour cela partager les vins en deux groupes distincts.

B. — *Composés réducteurs par la méthode au réactif de* DENIS-FOLIN

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de l'A. O. A. C. (réactif de DENIS-FOLIN) ne fait pas apparaître de séparation nette entre hybrides et *Vitis vinifera*, seulement un écart sensible sur les moyennes en faveur des hybrides (238 mg et 371 mg en catéchine (+) par litre, contre 195 et 264 mg pour les vins blancs de *Vitis vinifera*).

Les conditions annuelles apportent entre les deux séries une variation supérieure à celle que l'on peut observer entre les deux variétés ; ceci indépendamment des écarts expérimentaux possibles entre les deux séries de mesures.

Précisons bien que pour cet indice de polyphénols, ainsi que pour les deux suivants, les teneurs données sont purement conventionnelles ; la catéchine (+) est un étalon commode, mais présent normalement dans les vins en faibles quantités, vraisemblablement différentes de celles trouvées par nos techniques (non spécifiques de cette substance).

TABLEAU I

Série 1

Type	Cépage	Origine	Année	Courbes spectro. d'absorption		Composés réducteur (Denis-Folin)	Ortho-dihydroxy-phénols (Arnow)	Tanins peu condensés (vanilline)	Test du trouble caractéristique
				Couleur D.O. 425	Tannoïdes D.O. 265	Étalon catéchine (+) en mg/litre)			
Hybrides	*S. 11803*	Tours	1964	0,340	0,642	403	262	52,7	× (douteux)
	S. V. 5276	Tours	1965	0,300	0,885	309	63	10,6	+ (trouble)
	S. V. 5276	Blois	1965	0,230	0,550	256	123	25,8	+
	S. 4986	Cours-les-Cosnes	1965	0,280	0,628	242	196	8,3	+
	Semis d'hybrides	Tours	1965	0,210	0,635	253	188	8,5	+
	Baco 22 A	Blois	1965	0,250	0,558	228	130	9,3	+
	E. M. 932	Cours-les-Cosnes	1965	0,190	0,426	170	59	4,5	+
	E. M. 895-3	Cours-les-Cosnes	1965	0,210	0,456	170	60	4,5	×
	S. V. 12375	Narbonne	1965	0,180	0,197	114	53	8,0	+
	Moyenne			0,243	0,553	238	126	14,7	
Vitis vinifera	*Grenache blanc*	Narbonne	1965	0,220	0,448	260	238	13,3	— (limpide)
	Clairette blanche	Narbonne	1961	0,300	0,547	203	127	8,0	—
	Sauvignon	Blois	1965	0,190	0,555	221	116	11,2	+
	Terret blanc	Narbonne	1963	0,180	0,277	146	93	2,1	—
	Terret blanc	Narbonne	1965	0,130	0,228	141	88	7,7	—
	Chasselas	Cours-les-Cosnes	1965	0,200	0,575	228	101	17,0	+
	Gros-Vert	Narbonne	1966	0,160	0,512	170	18	8,5	×
	Moyenne			0,197	0,449	195	112	9,7	

TABLEAU 2

Série 2

Type	Cépage	Origine	Annés	Degré alcoolique	Acidité totale (g/l)	Acidité volatile (g/l)	Anhydride sulfureux (g/l)	Sucres (g/l)	Observations
Hybrides	*S. 11803* (A)	Tours	1967	11,90	6,80	0,26	67	2,5	Terrain argilo-siliceux (Touraine)
	S. 11893 (B)	Tours	1967	12,10	6,10	0,67	89	9,5	Terrain sablonneux (Vienne)
	S.V. 5276	Tours	1967	10,70	5,80	0,40	80	10,0	Vendange légèrement pourrie (SO_2 : 8 g/h)
	S. 4986	Cours-les-Cosnes	1966	12,20	6,40	0,17	48	2,2	
	J. S. 3255	Tours	1967	11,60	6,00	0,22	44	3,8	Terrain argilo-siliceux (Touraine)
	Ravat 6	Tours	1967	11,80	6,30	0,32	48	2,8	
	Ravat 6	Tours	1962	13,05	4,40	0,56	99	11,1	Terrain sablonneux (Vienne)
	Ravat 6	Cours-les-Cosnes	1966	13,05	5,10	0,23	89	1,7	Vendange légèrement pourrie (SO_2 : 8 g/h)
	Moyenne			12,05	5,86	0,35	70,5	5,45	
Vitis vinifera	*Grenache blanc*	Montpellier	1967	10,80	5,30	0,39	9	2,7	Sulfitage vendange (8 g/h)
	Clairette blanche	Lézignan	1967	10.80	5,10	1,16	19	3,9	
	Sauvignon	Lézignan	1967	14,10	3,90	0,36	19	1,3	
	Terret blanc	Montpellier	1967	11,20	5,20	0,59	19	5,2	
	Chardonnay	Montpellier	1967	10,40	/	/	9	3,1	(piqûre des vins au cours des mesures)
	Ugni blanc	Montpellier	1967	12,30	4,70	0,48	22	28,2	Sulfitage vendange (8 g/h)
	Picpoul	Lézignan	1967	11,20	5,00	0,42	16	2,2	
	Marsanne	Lézignan	1967	12,30	3,40	0,34	64	2,6	
	Moyenne			11,60	4,,65	0,53	22,1	6,15	

TABLEAU 3

Série 2

Type	Cépage	Origine	Année	Courbes spectro. d'absorption		Composés réducteurs (Denis-Folin)	Ortho-dihydroxy-phénols (Arnow)	Tanins peu condensés (vanilline)	Leuco-antho-cyanes — Leuco-cyanidine en mg/l	Test du trouble caracté-ristique
				Couleur D.O. 425	Tannoïdes D.O. 265	Étalon catéchine (+) en mg/l				
Hybrides	*S. 11803* (A)	Tours	1967	0,325	0,657	453	149	23,5	97,8	× (douteux)
	S. 11803 (B)	Tours	1967	0,240	2,725	420	72	8,0	47,9	+ (trouble)
	S. V. 5276	Tours	1967	0,170	2,200	289	48	3,0	32,8	+
	S. 4986	Cours-les-Cosnes	1966	0,290	0,590	324	110	9,0	29,6	+
	J. S. 3255	Tours	1967	0,140	0,535	333	68	14,0	25,0	+
	Ravat 6	Tours	1967	0,220	0,555	473	115	29,0	56,2	+
	Ravat 6	Tours	1962	0,190	0,450	324	72	19,0	13,5	+ à ×
	Ravat 6	Cours-les-Cosnes	1966	0,220	0,495	263	53	4,0	21,8	×
	Moyenne			0,224	1,026	371	86	13,7	40,6	
Vitis vinifera	*Grenache blanc*	Montpellier	1967	0,250	0,450	324	187	15,0	60,2	— (limpide)
	Clairette blanche	Lézignan	1967	0,340	0,375	333	154	27,0	69,7	—
	Sauvignon	Lézignan	1967	0,180	0,462	245	72	3,5	18,7	—
	Terret blanc	Montpellier	1967	0,170	0,300	219	78	11,0	33,3	—
	Chardonnay	Montpellier	1967	0,255	0,340	210	91	6,0	28,6	—
	Ugni blanc	Montpellier	1967	0,290	0,465	359	180	14,0	81,1	—
	Picpoul	Lézignan	1967	0,210	0,425	201	53	4,0	9,4	—
	Marsanne	Lézignan	1967	0,180	0,485	219	62	3,0	9,9	—
	Moyenne			0,234	0,413	264	110	10,4	38,9	

TABLEAU 4

Courbes U.V. solvant : eau distillée

Type	Cépage	Origine	Année	Minimum D.O. 230-260 nm	Maximum D.O. 260-290 nm	D.O. à 325 nm	D.O. 325 / D.O. 260-290	Observations
Hybrides	*S. 11803* (A)	Tours	1967	0,605 (256)	0,657 (270)	0,215	0,327	Dilution 1/20
	S. 11803 (B)	Tours	1967	0,330 (235)	0,545 (262)	0,025	0,046	Dilution 1/100
	S. V. 5276	Tours	1967	0,490 (235)	0,880 (262)	0,075	0,085	Dilution 1/50
	S. 4986	Cours-les-Cosnes	1966	0,580 (255)	0,590 (265)	0,280	0,475	Dilution 1/20
	J. S. 3255	Tours	1967	0,520 (250)	0,535 (262)	0,225	0,420	—
	Ravat 6	Tours	1967	0,535 (255)	0,555 (265)	0,220	0,396	—
	Ravat 6	Tours	1962	0,440 (255)	0,450 (265)	0,205	0,455	—
	Ravat 6	Cours-les-Cosnes	1966	0,495 (260)	0,495 (260)	0,185	0,374	—
Vitis vinifera	*Grenache blanc*	Montpellier	1967	0,340 (265)	0,450 (285)	0,435	0,967	Dilution 1/20
	Clairette blanche	Lézignan	1967	0,320 (262)	0,375 (280)	0,225	0,600	—
	Sauvignon	Lézignan	1967	0,440 (255)	0,462 (275)	0,260	0,563	—
	Terret blanc	Montpellier	1967	0,290 (262)	0,300 (275)	0,180	0,600	—
	Chardonnay	Montpellier	1967	0,330 (260)	0,340 (275)	0,240	0,705	—
	Ugni blanc	Montpellier	1967	0,340 (260)	0,465 (275)	0,440	0,945	—
	Picpoul	Lézignan	1967	0,375 (250)	0,425 (267)	0,175	0,412	—
	Marsanne	Lézignan	1967	0,460 (255)	0,485 (275)	0,300	0,618	—

TABLEAU 5

Courbes U.V. solvant : éthanol 10 p. 100-pH 3,2

Groupes	Cépage	Origine	Année	D.O. 232 nm	Minimum D.O. 230-260	Maximum D.O. 260-290	D.O. 325 nm	D.O. 265 / D.O. 232	Observations
I	*S. 11803*	Tours (A)	1967	0,290	0,280 (235)	0,525 (265)	0,025	1,81	Dilution 1/100
	S. V. 5276	Tours	1967	0,430	0,420 (235)	0,850 (265)	0,075	1,98	Dilution 1/50
II	*Ugni*	Montpellier	1967	0,865	0,360 (263)	0,460 (285)	0,440	0,53	Dilution 1/20
	Grenache blanc	Montpellier	1967	0,900	0,360 (263)	0,445 (285)	0,430	0,50	—
III	*Clairette*	Lézignan	1967	0,995	0,315 (260)	0,370 (275)	0,220	0,37	—
	Terret	Montpellier	1967	0,640	0,288 (260)	0,292 (275)	0,180	0,46	—
	Ravat 6	Tours	1962	0,800	0,455 (255)	0,462 (265)	0,200	0,58	—
	S. 4986	Cours-les-Cosnes	1966	0,920	0,260 (255)	0,570 (265)	0,270	0,62	—
	J. S. 3255	Tours	1967	0,795	0,480 (252)	0,495 (265)	0,180	0,62	—
	Picpoul	Lézignan	1967	0,630	0,380 (250)	0,420 (265)	0,170	0,67	—

C. — *Composés orthodihydroxyphénols*

Dans la première série, les vins d'hybrides sont plus riches (126 mg/l contre 112 mg/l) ; dans la deuxième série, c'est l'inverse (86 mg contre 110 mg).

Pour un même cépage et une même année, les variations peuvent être considérables. On retrouvera cette conclusion pour toutes les séries d'indices de polyphénols. On peut déjà avancer qu'il est peu probable d'espérer différencier les deux types de cépages par les seules évaluations globales de polyphénols prises isolément.

D. — *Tanins peu condensés réagissant avec la vanilline*

Dans les deux séries, les vins d'hybrides l'emportent nettement sur ceux de *Vitis vinifera* et les moyennes sont constantes d'une série à l'autre (voisines de 14 mg de catéchine (+) par litre et 10 mg/l).

Dans ce cas aussi, la variabilité pour un groupe ou un même cépage est trop importante pour que cette particularité soit exploitable pratiquement. On retiendra néanmoins cette tendance des hybrides à avoir cet indice de polyphénols plus élevé. En effet, RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966) ont montré, dans le cas des vins rouges, que les flavanes-3-ols ou flavanes 3-4 diols réagissant avec la vanilline sulfurique sont moins facilement entraînés par collage des vins à la gélatine ; ceci permettrait de supposer qu'ils sont sous une forme moins polymérisée. Malheureusement, cette particularité apparaît sans relation avec le trouble caractéristique des hybrides signalé précédemment (FLANZY et AUBERT, 1967).

E. — *Leucoanthocyanes* (tabl. 3)

La deuxième série donne une moyenne semblable (40,6 et 38,9 mg par litre) pour les vins d'hybrides et de *Vitis vinifera*. Ces teneurs en leucocyanidine, variant entre 9 et 98 mg/litre, sont du même ordre que les chiffres donnés par MASQUELIER (1963) pour les vins du Bordelais.

Il faut noter trois vins de *Vitis vinifera* particulièrement riches en leucoanthocyanes ; de même, les autres indices de polyphénols sont relativement élevés. Ce sont : le *Grenache*, la *Clairette* et l'*Ugni*, cépages donnant des vins particulièrement oxydables ; les indices de couleur (D.O. 425) sont en relation. Mais, le cas du *S.* 11803 montre que d'un échantillon à l'autre, pour une même origine et une même année, l'écart est important et, l'on peut supposer, fonction de la parcelle, de la qualité de vendange et surtout des facteurs technologiques (pressurage par exemple).

F. — *Étude des spectres dans l'ultraviolet* (tabl. 4 et 5)

Quel que soit le solvant utilisé, le maximum d'absorption dans la zone 260-290 nm est, dans la très grande majorité des cas, en faveur des vins d'hybrides. Pour la série 2 et à l'exception du *Ravat* 6 (1962) tous les vins d'hybrides ont une D.O. supérieure à 0,495 pour une dilution au 1/20 dans l'eau ; les vins de *Vitis vinifera* ont une D.O. inférieure à 0,485 dans les mêmes conditions. De plus, on peut noter un léger décalage dans la position du maximum d'absorption pour les deux types de vins. Les hybrides ont leur maximum entre 260 et 270 nm et les *Vitis vinifera* entre 267 et 285 nm.

Ce déplacement bathochrome de 265 nm à 275 nm des chromophores benzéniques des vins de *Vitis vinifera* par rapport aux hybrides serait-il dû à l'acidité totale en moyenne plus faible (tabl. 2) pour ces derniers ? La dilution au 1/20 dans les solvants permet d'avancer qu'il s'agit bien d'une caractéristiques des courbes UV des vins d'hybrides pour la série examinée.

De plus, on observe une autre particularité. Ainsi que l'a fait Berg (1953), on a étudié l'absorption relative des chromophores à 325 nm ; on sait que de nombreux polyphénols ont un sommet spectrophotométrique autour de cette longueur d'onde (acides chlorogéniques, cinnamiques, flavonols, etc.).

Les vins de *Vitis vinifera* ont un sommet ou un épaulement plus marqué à 325 nm que les vins d'hybrides (tabl. 4). Le rapport D.O. 325/D.O. 265-275 est particulièrement significatif ; pour les vins d'hybrides, ce rapport se situe entre 0,046 et 0,475 (tabl. 4), pour les *Vitis vinifera*, à l'exception du vin de *Picpoul* (1967), on trouve toujours plus de 0,563 ; le *Grenache* est particulièrement caractéristique avec 0,967.

Dans le tableau 5, on a rapporté la hauteur d'un sommet d'absorption se situant toujours à la même position 232 nm. Ainsi que l'a précisé P. Ribéreau-Gayon (1968), nous pensons aussi qu'il s'agit d'un artefact variable avec le solvant et l'équipement du spectrophotomètre utilisé. Toutefois, on peut l'utiliser très valablement comme nouvel indice de composés polyphénoliques. Puisais et *al.* (1968) montrent qu'il y a proportionnalité entre le sommet à 232-235 nm et celui à 275-280 nm lorsque les vins, rouges ou blancs, ne renferment pas de tanins exogènes ; ce qui leur permet de proposer une technique d'évaluation du leucocyanidol pur et de déceler un tanisage des vins lorsque le profil des courbes est différent.

Cette méthode nous paraît particulièrement intéressante lorsque les composés à structure flavane 3-ol (catéchines) ou flavane 3-4 diol (leucoanthocyanes) prédominent par rapport aux autres composés de nature phénolique ou de chromophores voisins.

L'étude du rapport $\frac{\text{D.O. } 265}{\text{D.O. } 232}$ permet de confirmer que les deux vins d'hybrides S. 11 803 B et S. V. 5276 ont été tanisés à des doses très sensibles ; ce qui peut aussi expliquer la nécessité dans ces deux cas de diluer au 1/100 et 1/50 pour les confronter aux autres vins blancs examinés (dilution 1/20).

Nous voyons apparaître là un nouveau facteur, l'introduction de tanins exogènes, qui complique encore le problème de la différenciation des vins d'hybrides blancs sur la base des composés phénoliques.

De l'ensemble des considérations précédentes, il ressort que l'on peut classer les vins en trois groupes distincts par le profil de leurs courbes spectrophotométriques en U. V. (fig. 1).

Le groupe I permettrait de singulariser certains vins d'hybrides tanisés (S. 11803 et S. V. 5276), sous réserve que les mêmes conditions de vinification soient approximativement reproduites.

Le groupe II serait typique de quelques cépages de *Vitis vinifera* (*Grenache, Ugni*, par exemple).

Le groupe III comprendrait la grande majorité des vins de toutes variétés d'hybrides ou *Vitis vinifera*.

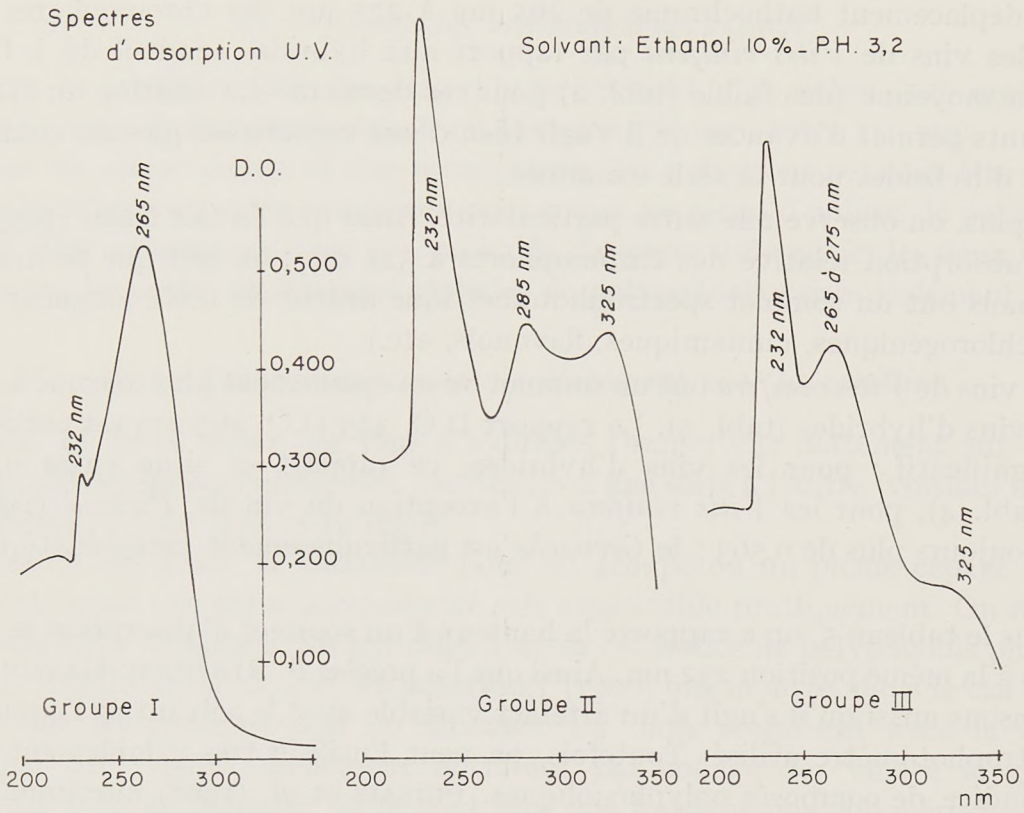

Spectres
d'absorption U.V.
Solvant: Ethanol 10% - P.H. 3,2
D.O.
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
232 nm
265 nm
232 nm
285 nm
325 nm
232 nm
265 à 275 nm
325 nm
Groupe I
Groupe II
Groupe III
200 250 300
200 250 300 350
200 250 300 350
nm

FIG. 1.

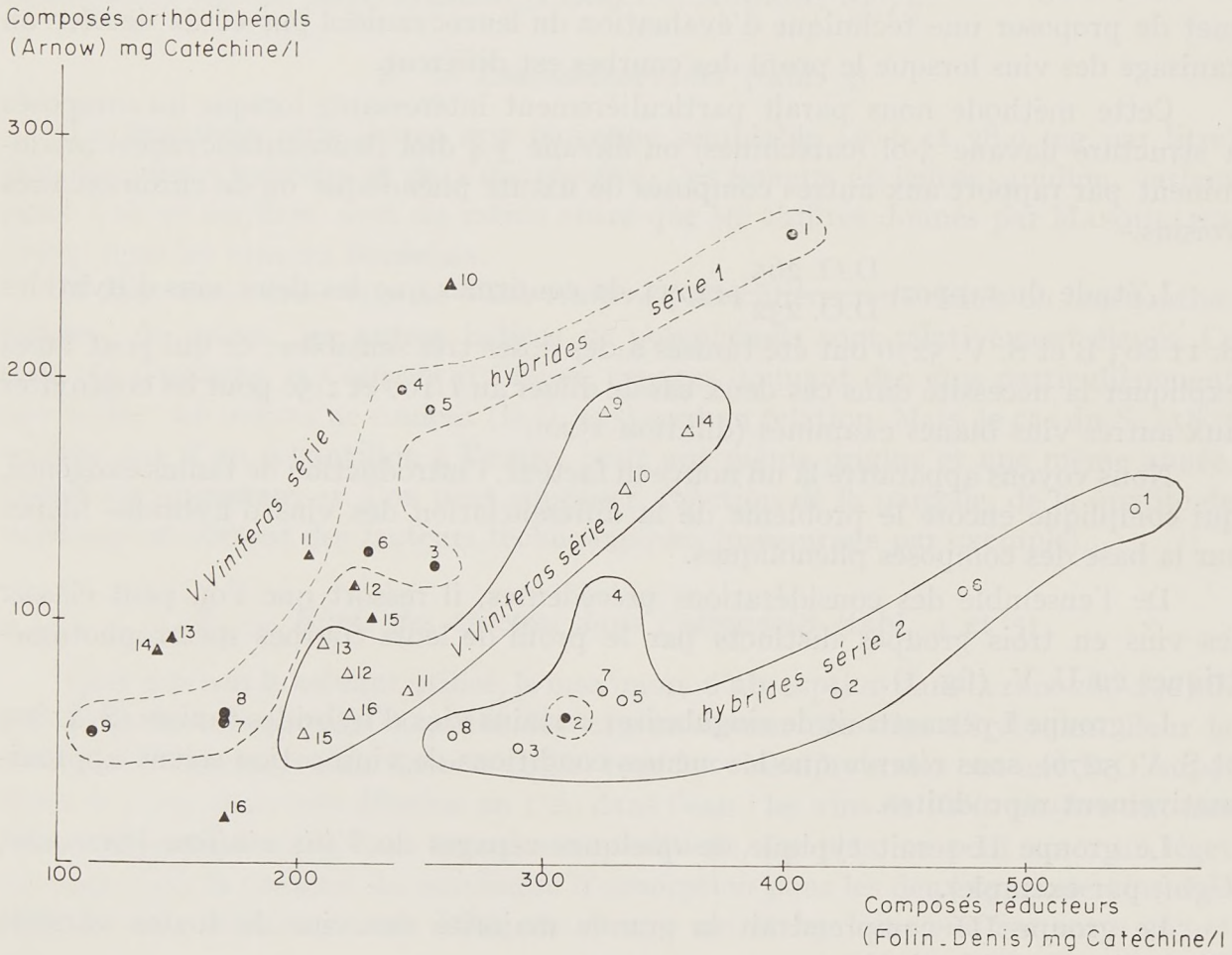

Composés orthodiphénols
(Arnow) mg Catéchine/l
300
200
100
hybrides série 1
V. Viniferas série 1
V. Viniferas série 2
hybrides série 2
100
200
300
400
500
Composés réducteurs
(Folin - Denis) mg Catéchine/l

FIG. 2.

Ainsi que l'a montré BERG (1953), une telle classification est arbitraire et dépend essentiellement des facteurs technologiques comme la maturité de la vendange. Mais, on peut envisager d'autres relations avec des caractéristiques peut-être plus constantes du cépage, par exemple l'aptitude à l'oxydation des vins par chauffage.

G. — *Corrélations entre indices de composés phénoliques*

D'une façon très générale, il existe des corrélations toujours positives entre les divers indices de composés phénoliques. Toutefois le calcul montre qu'elles ne sont significatives que pour quelques valeurs choisies ; sur l'ensemble des points, entre deux séries examinées, les coefficients de corrélation sont trop faibles pour donner une sécurité, d'où une signification, acceptable (d'après les méthodes statistiques de M. LAMOTTE, 1957).

Par exemple, nous avons été amenés à comparer l'indice U. V. à 232 nm avec l'indice U. V. à 265 nm. Le coefficient de corrélation des deux séries est positif : 0,185 ; mais une sécurité de 95 p. 100 demanderait un coefficient de 0,63 ; c'est-à-dire, il y a un lien entre les deux indices mais non formulable pour la série de vins considérée. Pratiquement ceci ne fait que traduire la différence considérable entre les vins du groupe 1 et les autres.

Par contre, la corrélation entre l'indice U. V. à 232 nm et l'indice par le réactif de Denis-Folin est de 0,88 avec une sécurité de 99 p. 100 ; en effet, dans les deux cas on doit exprimer une mesure très globale de composés semblables qui prédominent.

Cette relativité des corrélations envisagées, en fonction de l'échantillonnage et des indices choisis, apparaît encore mieux sur les diagrammes de dispersion dont la figure 2 est un exemple.

Sur l'ensemble des vins examinés, la corrélation composés phénoliques réducteurs (Denis-Folin) et composés orthodihydroxylés (ARNOW) est très grossière. Néanmoins, les vins d'hybrides d'une même série (1 et 2) et les vins de *Vitis vinifera* de la série 2 montrent des corrélations très significatives. Pour chacun de ces trois groupes l'alignement des points traduit une certaine constance dans la composition. Les trois zones se différencient nettement ; plus particulièrement dans la deuxième série de mesures, on pourrait parler de « zone des hybrides » et « zone des *Vitis vinifera* ». Cependant, cela n'est plus aussi caractéristique dans le cas des points de la première série.

En définitive, le rapport de ces deux indices de polyphénols ne permet pas de différencier pratiquement les vins de *Vitis vinifera* de ceux d'hybrides, bien qu'il apparaisse certaines tendances.

Des observations précédentes, il faut retenir aussi l'influence très importante de la région d'origine, c'est-à-dire des conditions écologiques, sur les teneurs en polyphénols des vins. PERI (1967) a signalé ce rôle considérable de la région dans le cas d'extraits du raisin blanc. De plus, d'autres travaux effectués à la Station Oenologique de Narbonne (POUX et AUBERT, 1968) ont montré que les conditions climatiques annuelles conditionnent quantitativement et qualitativement la composition des vins rouges en polyphénols.

Les mêmes conclusions seraient tirées sur de nombreuses corrélations possibles entre les divers indices de polyphénols expérimentés. Mais, il n'est pas irrationnel de

penser que d'autres indices encore plus spécifiques peuvent permettre de donner un moyen de différenciation exploitable analytiquement, puisque la distinction de certains cépages blancs est déjà possible visuellement, sur les nuances de couleur jaune.

Il faut néanmoins signaler une autre confrontation intéressante, car elle a fait l'objet de quelques interprétations sur la structure des tanins des vins rouges (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1966) ; le rapport : tanins peu condensés (réagissant avec la Vanilline : V) sur la teneur en leucocyanidine (Leucoanthocyanes : LA) renseigne sur l'état de condensation des polyphénols. Dans notre expérimentation, la variabilité de ce rapport V/LA est très grande et ne laisse apparaître aucune relation avec le caractère hybride. De plus, ces deux indices ne montrent pas de corrélation significative avec la défécation particulière des vins d'hybrides, objet de notre premier mémoire (Flanzy-Aubert, 1967).

H. — *Perspectives d'identification des hybrides blancs*

En résumé, les rapports de ces divers indices entre eux et avec le phénomène de trouble caractéristique précédemment étudié ne nous ont pas donné de relation remarquable pouvant différencier nettement hybrides et *Vitis vinifera*.

Toutefois, ces quelques indices qui portent sur des méthodes de principes différents, montrent une tendance générale des vins blancs d'hybrides à avoir des valeurs moyennes plus élevées. Peut-on espérer mettre en évidence d'autres formes de polyphénols qui concorderaient avec diverses propriétés observées chez de nombreux hybrides : défécation difficile, teneurs élevées en manganèse, madérisation accentuée et résistance du raisin aux altérations ?

Ces divers essais sont complémentaires des recherches entreprises par Kevei et Spanyar (1965) sur l'étude des pigments et des substances aromatiques des vins hongrois d'hybrides blancs.

Ces travaux n'ont pas encore abouti à révéler une voie simple de distinction des vins blancs.

Une observation intéressante de nos recherches est la présence de leucoanthocyanes, vraisemblablement sous une forme particulière, dans les vins rouges et blancs déféqués et décantés (Flanzy et Aubert, 1967, 1968). Ces polyphénols participeraient-ils au trouble caractéristique des hybrides ?

Les deux auteurs hongrois précédents avaient également fait une remarque dans le même sens en chauffant les vins avec de l'acide chlorhydrique dilué : « En général, le virage des vins d'hybrides était quelque peu supérieur à celui des vins de *Vitis vinifera*, mais la différence n'était pas assez importante pour pouvoir être mise à profit pour l'identification. »

Ces observations laissent entrevoir une voie possible de recherche dans la différenciation des hybrides blancs, par fractionnement et identification des isomères et des polymères leucoanthocyaniques ou des proanthocyanes acylés. On sait actuellement que les « tanins » ne sont pas uniquement constitués du noyau élémentaire leucocyanidol (P. Ribéreau-Gayon, 1964). D'autre part, les dosages individuels des très nombreux polyphénols de la pellicule et du pépin n'ont pas été suffisamment exploités en vue de la différenciation des hybrides blancs ; en particulier, les teneurs relatives en flavonols et en divers acides phénols.

Néanmoins, une solution simple au problème de la caractérisation des vins d'hybrides blancs ne nous apparaît pas possible actuellement.

Reçu pour publication en décembre 1968.

SUMMARY

EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WHITE WINES.
A COMPARATIVE STUDY OF SOME WINES FROM « VITIS VINIFERA »
AND FROM INTERSPECIFIC DIRECT-PRODUCER HYBRIDS

Evaluation characteristics for phenolic compounds in white wines from *Vitis vinifera* varieties and from interspecific direct-producer hybrids are proposed.

The study of ultra-violet spectra and the direct estimation of total phenolic reducing compounds of the *ortho*-dihydroxyphenol groups, the leucoanthocyanines and the less condensed tannins open up no new ways to a method of readily distinguishing hybrid white wines. A general tendency may be noted for hybrid white wines to have a higher content of phenolic compounds, particularly of the lesser polymerized flavonoids, than the *Vitis vinifera* wines examined.

In any case no simple method has yet been devised for distinguishing *Vitis vinifera* white wines from wines made out of the most common of the approved hybrids.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS BLANCOS.
ESTUDIO COMPARADO DE ALGUNOS VINOS DE « VITIS VINIFERA » Y DE CEPAS HÍBRIDAS
INTERESPECÍFICAS PRODUCTORAS DIRECTAS

Se proponen distintos índices de evaluación de los compuestos fenólicos de los vinos blancos, derivados de las cepas de *Vitis vinifera* o de cepas híbridas interespecíficas productoras directas.

El examen espectral ultravioleta y las dosificaciones directas de los compuestos fenólicos reductores totales, de las agrupaciones ortodihidroxifenoles, de las leucoantocianas y de los taninos poco condensados, no permiten vislumbrar nuevas vías de investigación en los estudios acerca de la caracterización de los vinos de híbridas blancas. Puede apreciar se una tendencia general de los vinos de híbridas blancas a acusar índices de compuestos fenólicos más elevados y, en particular, en flavanas menos polimerizadas, relativamente a los contenidos de los vinos de *Vitis vinifera* examinados.

De todos modos. la distinción certera entre los vinos blancos de *Vitis vinifera* y de híbridas reglamentadas, entre aquellas más conocidas, no es posible a ún aplicando un método sencillo.

RIASSUNTO

VALUTAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI DEI VINI BIANCHI.
STUDIO COMPARATO DI ALCUNI VINI DI « VITIS VINIFERA » E DI MAGLIOLI DI CEPPI IBRIDI
INTERSPECIFICI PRODUTTORI DIRETTI

Diversi indici di valutazione dei composti fenolici dei vini bianchi, provenienti da ceppi della varieta *Vitis vinifera* o da ibridi interspecifici produttori diretti, sono proposti.

L'esame degli spettri U. V. e i dosaggi diretti dei composti fenolici riduttori totali, dei gruppi orto-di-idrossido-fenoli, dei leucoantociani e dei tannini poco condensati, non fanno apparire nuove vie di ricerche negli studi sulla caratterizzazione dei vini d'ibridi bianchi. Si puó notare una tendenza generale dei vini d'ibridi bianchi ad avere degli indici di composti fenolici più elevati, più particolarmente in flavani meno polimerizzati, relativamente ai tenori dei vini di *Vitis vinifera* esaminati.

Ad ogni modo la distinzione certa tra vini bianchi di *Vitis vinifera* e di ibridi regolamentati, i più diffusi, non è ancora possibile con un metodo semplice.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARNOW L. E., 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixture. *J. biol. Chem.*, **118**, 531-537.

BERG H. W., 1953. Varietal susceptibility of white wines to browning. I. Ultraviolet absorption of wines *Food Research*, **18**, 399-406. II. Accelerated storage tests *Food Research*, **18**, 407-410.

COLAGRANDE O., 1961. Determinazione dei tannini nel vino. *Riv. Vitic. Enol.* **14**, 323-331.

FLANZY M., AUBERT S., 1967. Observations sur la défécation des vins de *Vitis vinifera* et d'hybrides. Essai de différenciation des vins d'hybrides blancs. *Ann. Technol. agric.*, **16** (3), 241-250.

FLANZY M., AUBERT S., 1968. Méthode de purification de l'ensemble des composés phénoliques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 1, 93-98.

FLANZY M., AUBERT S., 1969. Méthode de distinction rapide de quelques vins rouges de cépages hybrides interspécifiques producteurs directs par emploi du réactif sulfomercurique. *Ann. Technol. agric.* **18**, (1), 17-25

JAULMES P., 1951. *Analyse des vins*, 2e éd., Librairie Poulain, Montpellier, 192-202.

JOHNSON G., SCHAAL L. A., 1957. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acid in potato tuber tissus upon injury and their possible role in disease resistance. *Amer. Potato J.*, **34**, 200-209.

KEVEI E., SPANYAR P., 1965. Recherches sur l'identification des vins hongrois d'hybrides blancs. *Industr. aliment. agric.*, 1157-1166.

LAMOTTE M., 1957. *Initiation aux méthodes statistiques en biologie*, Masson et Cie, éd., Paris 6e.

MARGHERI G., 1960. Determinazione dei tannini nel vino mediante spettrofotometria nell'ultravioletto. *Riv. Vitic. Enol.*, **13**, 401-406.

MASQUELIER J., POINT G., 1955. Les substances vitaminiques P des vins blancs. Extraction et dosage. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **94**, 80-84.

MASQUELIER J., 1963. Dosage des leucoanthocyanes du vin blanc. Emploi de la poudre de polyamide. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **102**, 51-52.

MICHAUD J., 1966. Dosage colorimétrique des polyphénols réducteurs. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **105**, 219-224.

NICHIFORESCO E., COUCOU V., 1965. Sur le dosage des *o*-dihydrophénols de type acide caféique présents dans les feuilles d'artichaut. *Ann. pharm. fr.*, **23**, 419-427.

Official Methods of Analysis of the Association Official of Agricultural Chemists, 1960, 9e éd., 144 et 111.

PERI C., 1967. Evolution des polyphénols au cours de la maturation des raisins blancs, *IIe Symposium Intern. Œnologie*, Bordeaux, juin 1967, 47-51.

PRO M. J., 1952. Rapport on spectrophotometric determination of tannin in wines and whiskies. *J. Ass. offic. agr. Chem.*, **35**, 255-257.

PUISAIS J., GUILLIER A., LACOSTE J., HUTEAU P., 1968. Dosage spectrophotométrique des tanins. *Ann. Technol. agric.* **17**, (4), 277-285.

RIBÉREAU-GAYON P., 1957. Le leucocyanidol dans les vins rouges. *C. R. Acad. Agric.*, **18**, 197-199, 596-598, 821-823.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du vin. III. Les tanins. *Institut national de la Recherche agronomique*, Paris, 259-282.

RIBÉREAU-GAYON P., NEDELTCHEV Y., 1965. Discussion et application des méthodes modernes de dosage des anthocyanes et des tanins dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 321-330.

RIBÉREAU-GAYON P., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins*. Tome B, Librairie Polytechnique, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. anal.*, **48**, 188-196.

SINGLETON J. L., 1967 Fining phenolic relationships *Wines and Vines*, **48**, 23-25.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (1), 45-66.

MISE AU POINT

MÉTHODES D'ÉVALUATION ET VALEURS DE LA CHARGE POLLUANTE DES EAUX RÉSIDUAIRES DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

J. MOURGUES et J. MAUGENET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

PLAN

INTRODUCTION.

I. — LA DEMANDE BIOCHIMIQUE D'OXYGÈNE (DBO).
- A. — Méthodes par dilution.
- B. — Méthodes respirométriques.

II. — LA DEMANDE CHIMIQUE D'OXYGÈNE (DCO).
- A. — Méthodes chimiques.
  1. Iodate de potassium.
  2. Sulfate cérique.
  3. Permanganate de potassium.
  4. Bichromate de potassium.
  5. Comparaison des méthodes chimiques.
- B. — Méthodes physiques par combustion.

III. — RELATION LIANT LES DEMANDES CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE D'OXYGÈNE — CHOIX D'UNE MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA CHARGE POLLUANTE.

IV. — CHARGE POLLUANTE DES EAUX RÉSIDUAIRES DE QUELQUES INDUSTRIES ALIMENTAIRES.
- A. — Conserveries de fruits et légumes.
- B. — Industries betteravières.
  1. Sucrerie.
  2. Distilleries et levureries.

C. — Caves et distilleries vinicoles.
D. — Distilleries de pommes.
E. — Malteries et brasseries.
F. — Industries de la pomme de terre.
1. Féculerie.
2. Autres productions.
G. — Autres industries.

Conclusion.

Résumés.

Références bibliographiques.

INTRODUCTION

Le problème de la pollution des eaux par les effluents des industries alimentaires revêt une importance de plus en plus grande à cause du développement croissant de ces industries.

Lorsqu'on déverse ces eaux dans les milieux récepteurs : rivières, lacs ou étangs, on peut perturber l'équilibre biologique des plantes et animaux :

— par des modifications du pH, de la température, de la limpidité des eaux (matières en suspension) ;

— par l'apport de produits nocifs ou toxiques ;

— et surtout par la diminution de l'oxygène libre due à la décomposition des matières organiques par les bactéries des eaux.

Pour évaluer la charge polluante d'un effluent, pour connaître le composé le plus dangereux, pour contrôler les divers traitements utilisés, il importe d'avoir des méthodes précises. L'objet de ce travail est une revue des méthodes utilisées jusqu'à présent pour évaluer la charge des eaux résiduaires, méthodes basées sur la demande en oxygène. Après avoir exposé successivement les deux méthodes couramment utilisées : la demande biochimique d'oxygène (DBO) et la demande chimique d'oxygène (DCO), nous indiquerons les liens qui unissent ces deux valeurs, et les raisons du choix d'une méthode de détermination de la charge polluante.

Nous donnerons, dans une dernière partie, le volume, la charge et les caractéristiques physico-chimiques des eaux résiduaires de diverses industries alimentaires : conserveries de fruits et légumes, distilleries, malteries, brasseries et féculeries. Ces données nous permettront de chiffrer l'importance de la pollution et d'étudier l'utilisation de ces eaux.

I. — LA DEMANDE BIOCHIMIQUE D'OXYGÈNE (DBO)

La DBO représente la quantité d'oxygène nécessaire à des microorganismes pour obtenir en anaérobiose la métabolisation des substances organiques en CO_2 et H_2O.

A ce jour, ce test, malgré ses imperfections, constitue l'essai de laboratoire le plus simple pour représenter la cinétique du phénomène de la pollution des eaux.

La méthode la plus utilisée pour évaluer la DBO est la méthode par dilution ; elle est restée la méthode usuelle malgré l'apparition de nombreuses méthodes manométriques. Nous développerons surtout le premier mode opératoire en nous basant sur les travaux récents.

A. — *Méthodes par dilution*

Dans ces méthodes, l'eau brute tamisée est mélangée à une eau de dilution en proportion telle que les germes aérobies puissent disposer d'oxygène en excès. Le mélange est mis en incubation pendant 5 jours à une température de 20°C ± 1 et à l'obscurité pour éviter le développement des algues. On détermine la quantité d'oxygène consommé par différence entre l'oxygène dissous avant et après l'incubation et, connaissant le taux de dilution, on calcule la DBO de l'eau brute.

Ce test de la demande biochimique d'oxygène a soulevé de nombreuses polémiques et les méthodes diffèrent sur de nombreux points, comme l'a montré notamment Van Beneden (1962).

En ce qui concerne les traitements préalables de l'eau brute, la méthode officielle américaine (1965) préconise le tamisage et la neutralisation alors que selon Bouquiaux (1963) le tamisage ne s'impose pas ; en effet comme celui-ci se ferait avec un tamis à maille ouverte de 2 mm, l'utilisation d'une pipette de 2 mm de diamètre remplace avantageusement le tamisage. De même, selon cet auteur, les applications de la neutralisation sont rares, le pH courant se situant entre 4 et 10.

Pour ce qui est de l'eau de dilution, l'eau distillée doit être exempte de matières organiques et doit renfermer moins de 0,01 mg/l de cuivre. La norme belge NBN 407 (*Livre de l'Eau*, 1966) recommande d'utiliser de l'eau distillée additionnée de 300 mg de bicarbonate de soude alors que la méthode standard américaine préconise l'addition d'un tampon phosphate à pH 7,2 et de sels de NH_4^+, Ca^{++}, Mg^{++}, Fe^{+++}.

Selon la norme belge, cette eau de dilution doit être conservée dans des ballons en verre bouchés au coton pendant 2 à 3 semaines, à une température relativement élevée (22-23°C) pour éviter tout risque de sursaturation en O_2. On peut également aérer les ballons en les secouant ou en y envoyant un jet d'air comprimé (méthode américaine).

Pour le choix de la dilution il est préférable, selon Bouquiaux (1963) d'effectuer un essai préalable par le permanganate à froid en trois minutes ; on procède ensuite à cinq dilutions suivant une progression géométrique de raison 2 afin de choisir la dilution qui entraîne une consommation de 50 p. 100 de l'oxygène dissous (entre 33 et 66 p. 100 de la teneur initiale).

Ceci est utile lorsque l'on ne connaît pas *à priori* la charge de l'effluent ; dans le cas contraire on peut se fier au taux de dilution indiqué dans la méthode standard américaine.

Quant au taux de dilution, il ne doit pas dépasser le millième.

En ce qui concerne l'ensemencement de cette eau, l'unanimité est loin d'être atteinte : la norme belge NBN 407 préconise d'ajouter par litre deux gouttes de réactif d'ensemencement (filtrat d'une suspension fraîche de 5 g de terreau dans 100 ml d'eau distillée). Bouquiaux (1963) signale que l'ensemencement n'est indispensable que dans quelques cas rares, car il est assuré en fait par l'emploi général de pipettes ne passant pas à la laverie. On admet couramment que, dans les eaux résiduaires urbaines, la nature des composants organiques importe peu, car ces eaux renferment des substances facilement assimilables et parce qu'il y a toujours une flore susceptible de dégrader les substances organiques qui accompagnent les égouts.

Pour les eaux industrielles, les conditions d'application sont différentes ; si pour certaines, renfermant des hydrates de carbone, la nature de l'ensemencement peut avoir une influence limitée, pour d'autres il est indispensable d'avoir une flore adaptée.

Dans l'exemple donné dans le tableau 1, relatif à une eau résiduaire phénolée, les valeurs trouvées sont très différentes selon la nature de la flore utilisée.

Lorsque l'ensemencement avec une flore adaptée est nécessaire, il suffit d'ajouter à l'eau de dilution un peu d'eau de rivière ou de boue du lit prélevée en aval du point de déversement de l'eau résiduaire.

L'incubation doit se faire dans des flacons de 100 à 250 ml bouchés émeri, placés dans des

armoires ou des incubateurs d'eau thermorégulés à 20°C ± 1. Le dosage de l'oxygène dans les flacons, avant et après incubation, est généralement effectué par voie chimique, mais on peut utiliser les analyseurs d'oxygène équipés d'électrodes à oxygène recouvertes d'une membrane de polyéthylène (EYE et RITCHIE 1961). Ces appareils sont d'un maniement facile.

TABLEAU I

Influence de la nature de l'ensemencement sur les valeurs de la DBO d'une eau résiduaire phénolée
d'après HURIET et ROGEON (1965)

Dilution	Flore adaptée (DBO en mg/l)	Flore non adaptée (DBO en mg/l)
1/100	774	90
1/200	1 320	130

La méthode par dilution est d'une exécution et d'une interprétation assez délicates : aussi pour tester l'eau de dilution, la qualité de l'ensemencement et l'habileté du manipulateur, on utilise des solutions de DBO connues (glucose et acide glutamique).

La demande biochimique d'oxygène, dans les conditions usuelles (5 j à 20°C ou DBO_5) intéresse uniquement des substances assez facilement dégradables. Pour les composés dont la dégradation nécessite plus de cinq jours d'incubation, on doit faire appel à des DBO_{10}, DBO_{15}, DBO_{20} et même DBO_{100}.

Cette méthode permet de connaître la consommation d'oxygène au bout d'un temps déterminé ; si l'on veut mieux préciser les réactions d'oxydation biochimique qui risquent de se manifester après le rejet à la rivière, il faut suivre l'évolution de l'oxygène dissous à intervalle régulier et pour des durées pouvant dépasser cinq jours.

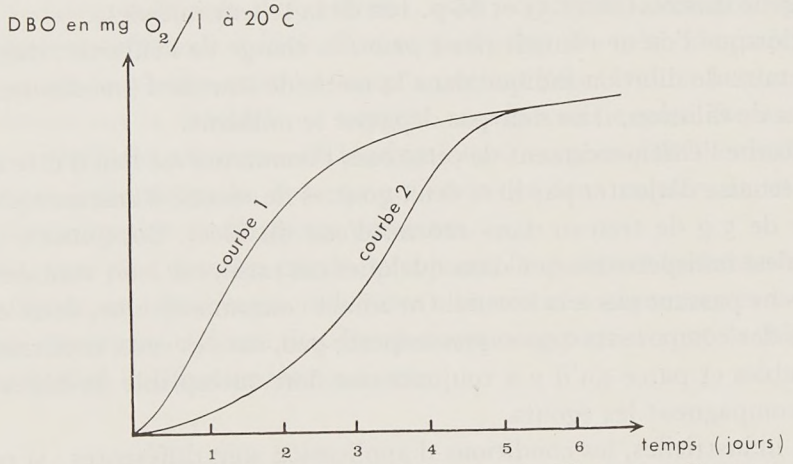


FIG. 1. — *Courbes d'évolution de la DBO* d'après HURIET *et* ROGEON (1965)

La figure 1 donne l'évolution de la DBO de deux eaux résiduaires différentes ayant au bout de cinq jours d'incubation la même DBO. Or, ces deux effluents à débit identique n'auront pas les mêmes effets au cours de leur déversement dans une même rivière ; dans un cas (courbe 1) nous avons une consommation rapide d'oxygène pouvant perturber la vie aquatique, alors que dans l'autre cas (courbe 2) la consommation d'oxygène, plus progressive, pourra être compensée par la réaération de la rivière.

D'après ZANONI (1967) la courbe 1 de la figure 1, qui est la plus classique, est beaucoup mieux représentée par une équation du second ordre que par une équation du premier ordre comme on l'admettait depuis longtemps. Le coefficient k tiré de l'équation de la courbe est un paramètre fréquemment utilisé par les auteurs américains pour caractériser la vitesse de biodégradation d'un composé (MOORE et RUCHHOFT, 1951). L'allure des courbes de la DBO dépend de la température, comme l'indique la figure 2. La première partie des courbes correspond à la métabolisation des composés carbonés, tandis que dans la seconde partie les composés azotés sont attaqués et la nitrification devient dominante.

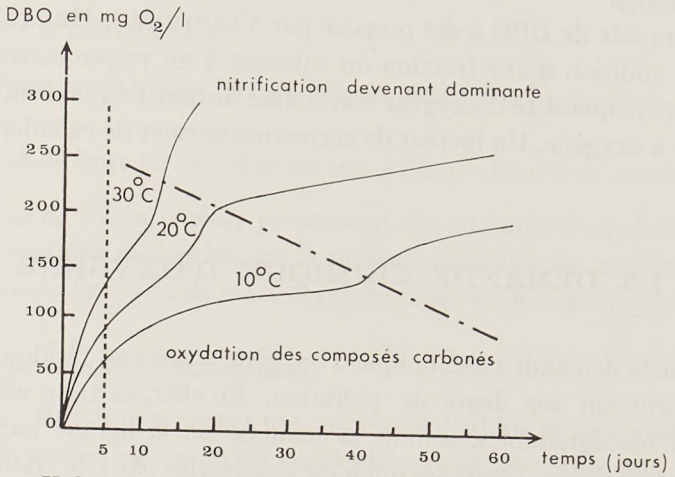


FIG. 2. — *Valeur de la DBO en fonction du temps à différentes températures selon* WEBB (1964).

Dans la plupart des cas, la quasi-totalité de la DBO est due aux microorganismes qui métabolisent les substances biodégradables, mais, par contre, dans les eaux contenant des proportions de composés minéraux ou organiques avides d'oxygène, il peut y avoir une consommation chimique d'oxygène soit immédiate (solution de sulfite contenant un catalyseur comme le chlorure de cobalt ou le sulfate de cuivre), soit plus lente (solution de sulfite sans catalyseur).

La demande immédiate d'oxygène (DIO) est déterminée après 15 minutes de contact avec l'eau de dilution d'après la méthode officielle américaine et après une heure d'après la méthode belge de VAN BENEDEN (1962).

La demande d'oxygène par autooxydation (DAO) est évaluée en utilisant un produit bactériostatique comme le chlorure mercurique (HURIET et ROGEON 1965). On peut donc connaître la consommation théorique consécutive à une simple oxydation sous l'effet de l'oxygène moléculaire ou consécutive à une simple fermentation bactérienne. Ceci permet de choisir un traitement approprié. Ainsi, si la demande d'autooxydation est importante, une simple aération peut aboutir à la stabilisation de l'effluent.

B. — *Méthodes respirométriques*

Des mises au point bibliographiques ont été faites par JENKINS (1960), MONTGOMERRY (1967). Les méthodes respirométriques, tout en respectant beaucoup plus que les méthodes par dilution les conditions d'épuration naturelle ou de traitement, permettent d'effectuer des mesures d'oxygène consommé plus ou moins en continu et d'étudier plus particulièrement l'effet de différents facteurs affectant la consommation d'oxygène.

Parmi les gros respiromètres utilisés pour les études sur le traitement des eaux résiduaires, l'appareil de PÖPEL, HUNKEN et STEINECKE (1958) est le plus simple ; un respiromètre électrolytique, dérivé de l'appareil de CLARK (1960) a été proposé par YOUNG, GARNER et CLARK (1965).

Parmi les petits respiromètres utilisés pour les mesures de routine au laboratoire, les plus utilisés sont l'appareil de SIERP modifié par GELLMANN et HENKELEKIAN (1951), et l'appareil de Warburg

utilisé pour la première fois en 1948 par CALDWELL et LANGELIER. Ces auteurs ont montré que les valeurs trouvées en 24 heures à 25°C par la méthode de Warburg représentent environ 75 p. 100 des valeurs de la DBO_5 à 20°C. Plus tard, en 1954, LEE et OSWALD comparent la méthode au Warburg et la méthode par dilution ; les valeurs données par les deux méthodes sont identiques. Cependant la méthode manométrique, bien que ne demandant pas plus d'habileté et de temps que la méthode par dilution, revient plus cher et ne convient pas pour les laboratoires effectuant de très nombreuses analyses. Elle nécessite aussi, selon HURIET et ROGEON (1965), des lectures et des remises au zéro d'autant plus fréquentes que la DBO est élevée. L'appareil de GILSON peut également être utilisé selon MONTGOMERRY (1967).

En outre, un test rapide de DBO a été proposé par VERNIMMEN, HENKEN et LAMB (1967) ; ce test est déterminé par addition d'une fraction du substrat à un respiromètre contenant une boue acclimatée, et on mesure la quantité d'oxygène consommé durant l'oxydation biochimique initiale à l'aide d'une électrode à oxygène. Un facteur de correction permet de calculer la DBO_5.

II. — LA DEMANDE CHIMIQUE D'OXYGÈNE (DCO)

La connaissance de la demande biochimique d'oxygène d'une eau résiduaire industrielle ne renseigne qu'imparfaitement sur son degré de pollution. En effet, certains effluents renferment des composés difficilement biodégradables, comme la cellulose ou la lignine par exemple, ou des substances toxiques. La charge de ces composés qui n'est pas décelée par DBO doit pouvoir être évaluée ; on fait appel dans ce cas à la demande chimique d'oxygène DCO, test qui utilise soit un oxydant bien défini : iodate de potassium, sulfate cérique, permanganate de potassium, bichromate de potassium, soit des méthodes physiques basées sur la combustion complète de l'échantillon.

Ce test représente la quantité d'oxygène nécessaire pour obtenir par oxydation brutale la combustion de la matière organique.

A. — *Méthodes chimiques*

1. *Méthodes à l'iodate de potassium.*

Cette méthode a été expérimentée par MOORE, KRONER et RUCHHOFT (1949). L'eau à analyser est ajoutée à un mélange d'iodate de potassium et d'acide sulfurique (65 à 80 p. 100) ; l'ensemble est chauffé à 200°C sous reflux, lorsque l'échantillon est riche en acides volatils. L'excès d'iodate est déterminé iodométriquement.

TOGASHI et HIRAYAMA (1966) ajoutent du sulfate d'argent comme catalyseur et dosent le gaz carbonique produit au cours de la réaction d'oxydation de même que IWASAKI et *al.* (1966), qui eux utilisent comme oxydant l'acide periodique.

2. *Méthodes au sulfate cérique.*

Ces méthodes ont été étudiées par KLEIN (1941), LECOQ (1956). Selon le pouvoir réducteur de l'eau on utilise du sulfate cérique $\frac{N}{8}$ ou $\frac{N}{80}$ en milieu sulfurique ; l'oxydation est effectuée à chaud sous reflux pendant 20 minutes. On titre en retour la solution de sulfate cérique par le sel de Mohr avec comme indicateur l'orthophénanthroline ferreuse, la diphénylamine ou l'acide phénylanthranilique.

3. *Méthodes au permanganate de potassium.*

Ces méthodes sont très utilisées ; elles ont subi de nombreuses modifications portant sur la durée, la température d'oxydation, le titrage de l'excès de permanganate.

La méthode standard américaine de 1946 préconise d'effectuer l'oxydation en milieu acide et à l'ébullition pendant 30 minutes ; lorsque les eaux à analyser sont riches en chlorures, l'oxydation en milieu alcalin est préférable. Un excès d'oxalate d'ammonium est ensuite ajouté et on titre en retour par le permanganate. Les nitrites, les ions ferreux, les sulfites, réduisent le permanganate ; une correction doit être effectuée pour chacun d'eux sauf pour les nitrites, dont l'interférence peut être supprimée en ajoutant de l'acide sulfamique (SUBRAHMANYAM, SASTRY, PILLAI 1959).

Dans la méthode usuelle française (RODIER, 1966), ont fait agir un excès de permanganate $\frac{N}{80}$ pendant 4 heures à la température ambiante. On ajoute ensuite un excès de sel de Mohr et on titre en retour par le permanganate.

En Angleterre WEBB (1964) dose l'excès de permanganate $\frac{N}{80}$ au bout de 4 heures à 27°C par iodométrie et préconise de faire en parallèle un test à l'hypochlorite de soude $\frac{N}{80}$. Les auteurs belges du Cebedeau (*Le Livre de l'Eau*, 1966), prescrivent des mesures d'oxydabilité à froid au bout de 3 minutes ; ce test donne une indication sur la présence probable de matières réductrices minérales (sulfites, sulfures, nitrites, Fe^{++}) ou de matières organiques facilement oxydables.

4. *Méthodes au bichromate de potassium.*

MOORE, LUDZACK, RUCHHOFT (1951) ont préconisé l'addition de sulfate d'argent au mélange sulfochromique afin d'oxyder les composés particulièrement résistants, tels que l'acide acétique et l'acide succinique (CORDEBARD, 1942).

Cette méthode, qui opère à chaud sous reflux pendant deux heures, oxyde la plupart des composés organiques sauf le benzène, le toluène et la pyridine ; elle est devenue la méthode officielle américaine (1965), en remplacement de la méthode au permanganate à chaud. L'interférence des chlorures et des nitrites est éliminée successivement par addition de chlorure mercurique (DOBBS et WILLIAMS, 1964) et d'acide sulfamique (SUBRAHMANYAN, SASTRY et PILIAI, 1959). L'excès de bichromate est titré par le sel de Mohr.

La méthode au bichromate a été expérimentée en France par DEVILLERS, LEMAITRE et DEYRAND (1967) ; ces auteurs ont confirmé l'élimination de l'interférence des chlorures par addition de chlorure mercurique et ont précisé les quantités de bichromate, d'eau et d'échantillon à ajouter en fonction de la DCO de l'échantillon.

D'autres auteurs ont cherché à améliorer cette méthode :

— en diminuant la quantité de réactif ajouté (FEARN et *al.*, 1967) ;
— en diminuant le temps de chauffage (JERIS, 1967).

Cette dernière méthode est intéressante par sa rapidité, puisqu'une analyse est effectuée en moins de 30 minutes, alors que la méthode officielle américaine demande trois heures.

Le bichromate utilisé peut ainsi être déterminé par colorimétrie (MCNARY, DOUGHERTY et WOLFORD 1957), et c'est ce qui a permis d'automatiser le dosage à l'aide d'un appareil Technicon à partir de fin 1961 (ZALEIKO et MOLOF, 1963 ; MOLOF et ZALEIKO, 1964 ; WAGNER, 1966 ; ADELMAN, 1968) ; on obtient les résultats en une demi-heure grâce à un minéralisateur en continu permettant un transfert de chaleur rapide.

5. *Comparaison des méthodes chimiques.*

De nombreux auteurs ont comparé ces différentes méthodes chimiques qui recommandent des oxydants variés et des conditions d'oxydation totalement différentes les unes des autres, certaines déterminations se faisant à froid, d'autres à chaud. Ainsi KLEIN (1941) trouve que la méthode au sulfate cérique donne des valeurs deux fois supérieures à celles du bichromate (sans Ag comme catalyseur) et deux à trois fois supérieures à la méthode au permanganate.

Selon MOORE, LUDZACK et RUCHHOFT (1951) la méthode au bichromate avec catalyseur se révèle supérieure à la méthode à l'iodate de potassium, au bichromate sans catalyseur et au permanganate. Un exemple d'analyse de vinasse de distillerie riche en acides acétique, propionique et lactique montre bien le rôle important joué par l'argent comme catalyseur.

Dernièrement, l'échelonnement des valeurs de la DCO a été signalé par HURIET et ROGEON (1965), LOSHAKOV et PRUSAKOV (1965), LESZCZYNSKI et SKWARA (1966), MIHAIL et MUSETESCU (1966), FOULDS et LUNDSFORD (1968).

Tous ces auteurs sont d'accord pour donner la préférence à la méthode au bichromate à chaud, qui oxyde la plupart des composés organiques. L'AFNOR étudie actuellement cette méthode et adoptera un mode opératoire normalisé.

B. — *Méthodes physiques par combustion*

STENGER et VAN HALL (1967) ont mis au point une méthode permettant d'obtenir des résultats en deux minutes. L'échantillon homogénéisé et dilué est injecté dans un tube de combustion en quartz chauffé à 875°C à l'intérieur duquel circule un courant de CO_2 ; les matières organiques réagissent avec ce dernier pour former de l'oxyde de carbone catalysé par du platine et dosé spécifiquement dans un analyseur infrarouge. Cette méthode permet de calculer la DCO à partir d'un étalonnage fait sur une solution d'acétate de sodium.

FORD (1968) se base sur la détermination du carbone organique total (COT) souvent en relation avec la DCO. Ce dosage est effectué dans un analyseur de carbone dans lequel l'eau est vaporisée : le gaz carbonique formé est directement mesuré dans un analyseur d'air. Le rapport $\frac{DCO}{COT}$ doit cependant être calculé pour chaque eau résiduaire ; il varie pour les eaux industrielles étudiées entre 1,75 et 4,70 et est supérieur à 6 lorsque ces eaux renferment des composés minéraux réducteurs (sulfite, thiosulfate).

III. — RELATION LIANT LES DEMANDES CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE D'OXYGÈNE. CHOIX D'UNE MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA CHARGE POLLUANTE

La détermination de la demande biochimique d'oxygène par la méthode de dilution est une opération longue et délicate : aussi de nombreux auteurs ont étudié les relations liant cette valeur à celle de la demande chimique en oxygène afin de pouvoir calculer les valeurs de la DBO sans procéder au dosage.

INGOLS et MURRAY (1948) comparent leur méthode au bichromate sous reflux mais sans sulfate d'argent à la DBO_5 et DBO_{20} d'effluents divers. Les valeurs de la DBO_{20} sont approximativement identiques à celles de la DCO alors que les valeurs de la DBO_5 représentent 68 p. 100 des valeurs de la DCO.

MOORE et RUCHHOFT (1951) trouvent des valeurs identiques pour des eaux d'égouts urbaines décantées en comparant leur méthode au bichromate sous reflux avec sulfate d'argent à la DBO_5. Ils affirment que l'on peut établir un rapport entre ces deux valeurs pour des effluents industriels ayant une composition sensiblement constante, mais qu'il n'y a pas de règle générale liant ces deux valeurs. En outre, d'après KAUFMAN (1954), ce rapport change avec la nature et l'importance du traitement d'épuration.

En 1954, AMBROSE et REISER travaillant sur des eaux résiduaires de féculerie notent une assez

bonne corrélation pour les eaux protéiques qui ne renferment pas de débris cellulosiques et une corrélation moindre pour les eaux de lavage de la fécule.

En 1955, LAWTON conclut que le rapport liant la DBO à la DCO varie considérablement avec le type d'eau résiduaire provenant de conserverie de pois et de maïs, mais que ce rapport varie relativement peu pour une eau résiduaire provenant de la même source.

D'après MERCER et ROSE (1956) les valeurs de la DBO_{20} d'eaux de conserveries sont voisines de celles de la DCO alors que les valeurs de la DBO_5 n'en représentent que 69 p. 100 (tabl. 2).

TABLEAU 2

Comparaison des valeurs de DBO_5 et DCO de quelques eaux résiduaires (en mg O_2/l)

Auteur	Nature de l'effluent	DBO_5^*	DCO**	$\frac{DBO_5}{DCO}$
MOORE et RUCHHOFT (1951)	Distillerie	725	902	0,804
AMBROSE et REISER (1954)	Féculerie — eau protéique	5 400	7 090	0,762
	Féculerie — eau lavage fécule	1 680	2 920	0,575
MERCER et ROSE (1956)	Conserverie — eau blanchiment pois	22 200	32 540	0,682
	Conserverie — abricot	2 383	3 456	0,689
	Conserverie — pêche	1 270	1 767	0,719
	Conserverie — pomme	3 137	4 480	0,700
MC NARY, DOUGHERTY et WOLFORD (1957)	Traitement agrumes	1 462	2 280	0,641
VOGL, SCHUMANN et WERNER (1966)	Brasserie	364	512	0,710
	Malterie	358	442	0,810
	Distillerie	778	1 070	0,727
OPLINGER (1968)	Conserverie pêches	2 913	6 009	0,485

* Méthode par dilution ** Méthode au bichromate de K

McNARY, DOUGHERTY et WOLFORD (1957) trouvent sur des effluents d'usines de traitement d'agrumes des valeurs de DBO_5 représentant 64 p. 100 des valeurs de la DCO.

En 1958, McMILLAN, YORK et VAUGHN comparent ces deux méthodes au cours de l'épuration des vinasses de distilleries vinicoles déversées dans un égout urbain. Les valeurs de la DBO_{20} sont beaucoup plus proches des valeurs de la DCO que la DBO_5, car divers composés comme les matières polyphénoliques, ou des débris végétaux en suspension, sont dégradés biologiquement de façon lente. La prévision de la DBO à partir de la DCO est beaucoup moins précise que pour les eaux domestiques brutes, mais la corrélation est cependant statistiquement significative, le rapport $\frac{DBO}{DCO}$ du mélange vinasse-eau urbaine étant de 0,65 pour des valeurs de la DCO supérieures à 500 mg/l.

BAKER-MUNTON (1964) trouve que sa méthode colorimétrique au bichromate est en accord ou légèrement supérieure à la DBO_5 ; cette méthode a été reprise ultérieurement par VOGL, SCHUMAN et PETERS (1965).

En 1966, VOGL, SCHUMANN et WERNER, travaillant sur 28 échantillons d'eaux résiduaires de brasserie, distillerie et malterie, indiquent des rapports $\frac{DBO}{DCO}$ variant de 0,71 à 0,81 (tabl. 2).

En 1968, OPLINGER trouve des corrélations significatives entre les valeurs de la DBO, DCO, de l'extrait sec et de la matière organique des eaux résiduaires de conserveries de pêches.

Il est donc possible de calculer la DBO à partir de la DCO à condition de faire le rapport sur une

eau de même nature. Nous allons voir maintenant quelle est la méthode à utiliser de préférence pour déterminer la charge polluante des eaux résiduaires des industries agricoles.

Les industries agricoles ayant une activité saisonnière et des possibilités limitées en équipement de laboratoire, la plupart des auteurs recommandent d'utiliser pour évaluer la charge polluante des eaux les méthodes d'oxydation chimique qui donnent des résultats rapides et reproductibles. Certains même, comme OPLINGER (1968), conseillent d'utiliser uniquement l'extrait sec et les matières organiques pour estimer la demande en oxygène dans le cas des conserveries de pêches.

La demande biochimique d'oxygène est moins précise (résultats à ± 20 p. 100 contre ± 8 p. 100 à la méthode chimique) selon BALLINGER et LISHKA (1962) et demande un temps plus long ; elle est cependant utile pour évaluer la teneur en composés biodégradables ; ainsi selon SYMONS , MCKINNEY et HASSIS (1960) un rapport $\frac{DBO}{DCO}$ voisin de 0,6 indique une eau pouvant être aisément et complètement épurée. Par contre, lorsque le rapport est égal à 0,2 l'eau analysée contient des corps difficilement dégradables nécessitant l'utilisation de microorganismes acclimatés. On a également une idée, bien qu'imparfaite, du comportement de l'eau déversée en rivière.

La connaissance de la DBO et du volume des eaux résiduaires permet d'en évaluer le pouvoir polluant total. Afin de comparer entre eux les différents effluents, quelle que soit leur origine, on utilise couramment la notion d'équivalent-habitant ou de population équivalente. Cette notion s'est d'abord posée pour les eaux d'égouts urbaines et, afin de comparer les charges polluantes des différentes villes, on a été amené à définir une charge polluante en gramme d'oxygène absorbé dans l'eau par habitant et par jour.

Ce chiffre varie selon les auteurs : il est de 54 par habitant et par jour pour IMHOFF (1964), de 60 pour les auteurs belges et de 75 pour les auteurs anglo-américains. Ces valeurs ont été analysées récemment par POBIS (1968).

La notion d'équivalent habitant est utilisée pour comparer les effluents des diverses industries; dans ce qui suit, les équivalents en population seront calculés d'après les chiffres d'IMHOFF (54 g O_2/habitant/jour).

IV. — CHARGE POLLUANTE DES EAUX RÉSIDUAIRES DE QUELQUES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

A. — *Conserveries de fruits et de légumes*

Les conserveries traitant les fruits et les légumes ont généralement des activités saisonnières et travaillent plusieurs espèces au cours de campagnes relativement courtes.

Le volume et la composition des eaux usées varient non seulement au cours d'une même journée mais encore selon les fruits et les légumes travaillés, comme le montre le tableau 3.

Selon LEFEBVRE (1952), la DBO des eaux résiduaires des conserveries américaines varierait en saison de pois entre 1 000 et 4 000 ; les jus des silos de fanes de pois ayant une DBO très élevée, voisine de 35 000, contiendraient la moitié des déchets solubles produits pendant la fabrication des conserves de pois. En Belgique, EDELINE, LAMBERT et HEUZE (1965), trouvent aussi des charges très élevées pour les conserveries de pois, et SCHELTINGA (1968) signale que les eaux résiduaires de fabrique de choucroute ont une DBO de 30 000.

Le volume et la charge polluante des eaux résiduaires de conserverie varient aussi selon le type d'eau. On distingue en effet :

1° les eaux de lavage, de transport et de rinçage. Leur volume est considérable et elles entraînent surtout les matières insolubles telles que du sable, de la terre et des débris cellulosiques ;

2° les eaux de blanchiment riches en substances solubles et fermentescibles (sucres et acides

Volumes et concentrations des eaux usées de conserveries

		Consommation en m³ par t de matière manipulée ou fabriquée	Matières en suspension en mg/l	DBO_5 en mgO_2/l	Charge en kg de DBO_5 par t de matière manipulée ou fabriquée	Équivalent en population par t de matière manipulée ou fabriquée
	Légumes					
A	Haricots verts	11,6		400	4,65	86
	Haricots de Lima	13,8		450	6,20	115
	Betteraves rouges	6,9	1 120	2 500	17,20	319
	Carottes	6,6	1 830	1 110	7,30	135
	Maïs	6,9	980	3 000	20,70	383
	Jus du silo de maïs			27 000		
	Pois	6,9	2 800	2 400	16,60	307
	Jus du silo de pois	0,55		35 000		
	Pickles		200	3 000		
	Pommes de terre		990	220		
	Épinards (en feuilles)	5,5	3 500	6 000	32,20	596
	Tomates entières	4,15	190	570	2,32	43
	Fruits					
	Abricots	15,2	260	380	6,90	128
	Cerises	11,0	20	750	8,30	154
	Citrons	13,8	268	1 860	25,80	478
	Jus de citron	13,8	171	343	4,75	88
	Raisins		1 650	720		
	Poires	14,1	310	450	6,30	117
B	Épinards	31,00		615	19,0	352
	Abricots	19,5		1 020	19,9	369
	Pêches et poires	12,0		1 340	16,08	298
	Tomates	8,5		990	8,4	156
C	Pois	20		1 320	31*	574
	Pois et carottes	13,7		855	12	222
	Haricots	21,5		330	6,8	126
	Pois, carottes et haricots	6,0		100	6,6	122
D	Jus de fruit usine A	1,5		1 900	2,6	48
	Jus de fruit usine B	1,5		3 800	5,7	105

A aux U. S. A. d'après ELDRIDGE (1947) cité par LEFEBVRE (1952). B aux U. S. A. d'après JUDELL (1965). C en Belgique d'après EDELINE, LAMBERT et HEUZE (1965). D en Allemagne d'après DITTRICH (1966). * Les auteurs tiennent compte de la charge de la fosse de refroidissement.

organiques), en colloïdes et en débris très fins. EDELINE, LAMBERT et HEUZE (1965) trouvent que ces eaux ont des DBO allant de 8 000 à 13 000 pour les pois, 4 000 à 9 000 pour les carottes, de 3 000 à 6 000 pour les haricots. Leur volume est comparativement faible ;

3° les eaux de nettoyage des appareils ;

4° les eaux de refroidissement des boîtes ou des condenseurs frigorifiques qui sont des eaux peu chargées mais tièdes.

A ces types d'effluents s'ajoutent les eaux de pelage de fruits (pêches, poires...) et de certains légumes (carottes, salsifis, pomme de terre...) qu'il convient de tamiser pour éliminer les matières solides en suspension. Ces eaux contiennent en outre des matières organiques en solution et sont alcalines lorsque le pelage est effectué par voie chimique.

Il y a aussi des risques de pollution par des déversements de saumures ou de sirops lors du remplissage des boîtes. Selon HOLDSWORTH (1968) la saumure ajoutée aux petits pois contenant 20 à 30 g de sucre par litre aurait une DBO de 25 000 et les sirops pour fruits à 400 g de sucre par litre une DBO de 400 000.

Les eaux résiduaires de conserveries sont assez bien équilibrées en éléments nutritifs ; EDELINE et *al.* (1967) indiquent, pour un effluent d'une usine de macédoine de légumes ayant une DBO de 820 mg/l, une teneur en azote et en phosphore de 64 et 11 mg/l. Ces teneurs sont supérieures aux limites admises couramment pour assurer une bonne épuration biologique car il faut avoir :

$$\frac{DBO}{N} \geqslant \frac{150}{5} \quad \text{et} \quad \frac{DBO}{P} \geqslant \frac{150}{1}$$

Il convient de noter aussi que les fruits et légumes surgelés ou déshydratés dont la production se développe actuellement demandent pratiquement la même quantité d'eau que la conserverie (HOLDSWORTH, 1968).

Les eaux résiduaires de jus de fruits que nous pouvons rattacher à la conserverie ont été analysées par DAMM (1964) et par DITTRICH (1966) en Allemagne. Selon ce dernier auteur, les jus de fruits sont très riches en matière organique puisque la DBO_5 varie de 61 000 pour un jus d'orange à 113 500 pour un jus de cassis, et les eaux résiduaires de ces industries sont très chargées comme l'indique le tableau 3.

B. — *Industries betteravières*

1. *Sucreries.*

La campagne sucrière, d'une durée moyenne de 60 jours, met en œuvre des quantités considérables d'eau.

Les eaux se répartissent ainsi :

1° Les eaux de transport et lavage des betteraves appelées « eaux boueuses » ; elles contiennent surtout des matières minérales en suspension (terre, argile, sable).

2° Les eaux sucrées qui comprennent :

a) les eaux de vidange et rinçage des diffuseurs et les eaux de presses à pulpe. Ces eaux forment un effluent appelé « petites eaux ».

b) les eaux de délayage des écumes ou des tourteaux de carbonatation : ces eaux sont très polluantes, car elles renferment 25 p. 100 de CO_3Ca, de sucre et de matière organique.

Ces deux types d'eaux résiduaires sont nettement différents : le premier, peu fermentescible, est fortement chargé de matière décantable, le second a une teneur très élevée en matière organique biodégradable, et transporte peu de matières boueuses.

Le tableau 4 donne la charge polluante de divers types d'eaux résiduaires de sucrerie.

TABLEAU 4

Bilan théorique moyen des eaux en sucrerie sans aucune réutilisation
d'après DEVILLERS (1968)

Poste	Consommation (m^3/t)	Rejet (m^3/t)	Ordre de grandeur en mg O_2/l		Pollution en kg/t (eau décantée)	
			DCO	DBO	DCO	DBO
Transport et lavage des betteraves	6,000	6,000	800	300	4,8	1,8
Alimentation de la diffusion :						
— à vases.....	2,200	1,000	2 500	1 000	2,5	1,0
— continue.....	1,200	0				
Pressage des pulpes :						
— normal.....	0	0,500	5 000	2 000	2,5	1,0
— haute pression	0	0,750	7 000	3 000	5,00	2,3
Lait de chaux et lavage des filtres	0,100	0				
Eau de dilution des écumes	0,200	0,200	10 000	5 000	2,0	1,0
Évaporation (eau condensée)	0	0,900	200	80	0,2	0,1
Condenseur barométrique (dernier corps évaporation cuites)	4,000	4,100	100	40	0,4	0,2
Clairçage du sucre.....	0,010	0				
Échangeurs d'ions décalcification	0,050	0,050	200	100	0	0
Totaux { Minimum	11,500	11,700			9,9	4,1 *
Totaux { Maximum	12,500	12,700			12,4	5,4

* Soit un équivalent en population de 76 à 100 habitants par tonne de betterave traitée.

D'après BIDAN, on peut dire que les effluents de sucrerie ont :

— une forte DBO_5, très variable selon l'origine, allant de 40 (eaux de condenseurs) à 10 000 (eaux de délayage dans les écumes) ;

— une quantité importante de substances se dégradant facilement : sucres, acides aminés.

— une certaine quantité d'azote (de 150 à 500 mg/l) pour les petites eaux et les eaux de transport des écumes ;

— une faible quantité de phosphore, sauf peut-être dans les écumes.

— un pH neutre ou alcalin (eau de délayage des écumes)

— une température variant de 10° à 50°C.

2. *Distilleries et levureries.*

Les vinasses de betteraves contiennent en proportion variable les mêmes éléments que les jus fermentés initiaux : glycérol, acides organiques (acides acétique, succinique, oxalique, malonique), des pentoses, des acides aminés et des dérivés de protéines de betteraves (LEFRANÇOIS, 1953). Elles ont, toujours d'après cet auteur, des températures élevées et des pH voisins de 3. Leur charge est élevée, et leur teneur en azote importante, comme l'indique le tableau 5. Ce même tableau donne les caractéristiques des eaux résiduaires d'une fabrique de levures à partir de mélasse de betteraves.

TABLEAU 5

Caractéristiques physico-chimiques des eaux résiduaires d'une distillerie et d'une levurerie betteravière
d'après POPESCU, MIHAIL et ROVENKO (1968)

Caractéristiques	Distillerie		Levurerie			
	Vinasse	Mélange lavage et refroidissement	Eaux de séparation I	Eaux de séparation II	Eaux du filtre rotatif	Mélange eaux résiduaires concentrées
pH	5	6,5	5,5	6	6	6,5
Température (°C)	92	31	34	22	—	29
DCO au $K_2Cr_2O_7$ en mg O_2/l	89 100	2 390	9 083	1 840	5 060	5 353
DBO à 5 j en mg O_2/l	21 700	510	7 268	1 750	2 000	2 980
Phosphates en mg de P_2O_5/l	—	—	—	—	0,44	—
Azote en mg de N/l	3 950	21,7	—	—	70	644
Matières en suspension totales sèches en mg/l	3 780	12	7 288	—	3 412	174
Matières en suspension calcinées en mg/l	250	8	808	—	236	16
Matières totales sèches en mg/l	73 380	750	9 096	2 120	1 472	4 848
Matières totales calcinées en mg/l	—	300	2 704	720	416	2 020

C. — *Caves et distilleries vinicoles*

Les eaux résiduaires des caves de vinification ont été étudiées par KLOTTER et HANTGE (1965). Les eaux de lavage des cuves de fermentation, des cuves de garde après soutirage, du matériel de vinification et de traitement, contiennent beaucoup de matières en suspension ; il convient tout particulièrement de centrifuger ces eaux afin de les rendre moins polluantes, comme le montre le tableau 6.

TABLEAU 6

Charge polluante des grandes caves de vinification allemandes
d'après KLOTTER et HANTGE (1965)

	Sans centrifugation	Après centrifugation
DBO_5 en g/hl de vin	540 à 820	17 à 34
Équivalent habitant/hl de vin	10 à 15	0,3 à 0,6

Les sous produits (marcs, lies, vins défectueux) sont envoyés en distillerie et les vinasses qui en sont issues sont très polluantes.

On distingue trois catégories de vinasses : les vinasses de piquette provenant de la distillation du liquide de diffusion des marcs fermentés, les vinasses de vins provenant de la distillation des vins et enfin les vinasses de lies provenant de la distillation du liquide d'essorage des lies.

TABLEAU 7

Charge polluante des vinasses de distilleries vinicoles

Type de vinasse et auteur	pH	DBO_5 à 20° en mg/l			DCO (mg O_2/l)
		Max.	Min.	Moy.	
Vinasse vin et piquette : VAUGH et *al.* (1958)	4,0	3 600	1 700	2 200	—
Vinasse vin : SOEIRO et DE LIMA (1960)	3,5	—	—	24 000	10 848 (méthode de KUBEL-TIEMAN)
Vinasse vin : FLANZY et *al.* (1967)	3,5	—	—	—	6 700 (méthode permanganate-RODIER)
Vinasse lie : VAUGH et *al.* (1958)	3,9	38 000	2 000	18 000	—

La composition chimique des vinasses est variable : elle varie avec le type de vinasse et avec la matière première d'où elles proviennent. Elles renferment, à l'exception de l'alcool, les mêmes substances organiques que le vin : glycérol, acides organiques (acétique, tartrique, lactique), sucres résí-

duaires, substances polyphénoliques, et ont un pH acide voisin de 4. Un bilan analytique des vinasses de vins a été donné par FLANZY (1936).

La demande chimique et biochimique de ces eaux est variable comme l'indique le tableau 7.

Les vinasses de lies sont les plus dangereuses, car elles sont riches en composés tartriques et en matières en suspension.

Le volume de ces eaux est très grand ; selon VAUGHN et MARSH (1953) il varie entre 600 et 1 300 litres par tonne de vendange avec une moyenne de 800 litres, soit presque autant que la quantité de vin produite. Or, comme la période de distillation est très courte, ces eaux sont très dangereuses ; c'est ainsi qu'une distillerie rejetant par jour 1 000 hl de vinasses, ayant une DBO de 15 000 mg/l, est équivalente à une ville de 25 000 habitants.

D. — *Distilleries de pommes*

La composition des cidrasses étudiées par WARCOLLIER (1930) varie selon le mode d'épuisement des pulpes de pommes et de clarification des jus allant à la fermentation. Elles renferment en suspension des débris cellulosiques et des cellules de levures et en solution des acides malique et lactique, des matières pectiques, minérales et azotées, des tanins et du glycérol.

E. — *Malteries et brasseries*

La charge polluante des eaux résiduaires de malterie provient en grande partie des eaux de trempage, comme l'indique le tableau 8 donné par BEECKMANS et *al.* (1954). Ces eaux de trempage sont généralement tièdes, ont des pH voisins de la neutralité et renferment des matières solides en suspension provenant du lavage des grains ainsi que des matières solubles extraites au cours du trempage.

TABLEAU 8

Charges journalières des eaux résiduaires d'une malterie
d'après BEECKMANS et *al.* (1954)

Nature des eaux	Consommation en m^3 par t d'orge	Matières en suspension en mg/litre	DBO_5 en mg O_2/l	Charge en kg de DBO par t d'orge
Eau du 1er trempage.....	1	875	760	0,760
Eau du 2e trempage	1	425	480	0,480
Eau du 3e trempage	1	330	540	0,540
Eau du 4e trempage	1	210	540	0,540
Eau du 5e trempage	1	160	341	0,341
Eau du 6e trempage	1	141	220	0,220
Eau de lavage germoirs ..	0,33	143	250	0,083
Décuvage	1 à 4	—	—	—
Divers { nettoyage locaux	0,83	—	—	—
Divers { perte par écumage				
Charge totale de l'ensemble des eaux.....	8,2 à 11,2	—	265 à 361	2,964*

* Soit un équivalent en population de 55 habitants par tonne d'orge.

TABLEAU 9

Charge polluante des eaux résiduaires d'une brasserie moyenne (360 hl bière/jour)
d'après BEECKMAN et *al.* (1954)

Nature des eaux	Consommation en m³ pour 100 hl de bière	Matières en suspension en mg/l		DBO_5 en mg O_2/l	Charge en kg de DBO pour 100 hl de bière
		totales	après décantation 2 h		
Lavage des fûts	4,08	43	30	51	0,210
Lavage des bouteilles	0,33	177	114	936	0,309
Premier rinçage des bouteilles	0,33	56	51	48	0,016
Deuxième rinçage des bouteilles	15,64	0	0	1	0,013
Lavage cuve d'empâtage	0,14	11 490	1 608	250	0,347
Lavage cuve filtrante	0,64	2 393	47	4 366	2,778
Lavage bac à houblon	0,23	843	177	462	0,103
Lavage cuve d'ébullition	0,45	236	88	180	0,080
Lavage filtre à trouble	0,75	4 998	326	25 549	19,055
Lavage cuve préfermentation	0,41	417	338	1 199	0,486
Lavage cuve fermentation	1,28	10 671	84	3 842	4,930
Lavage tank de garde	1,17	8 152	1 076	14 526	17,028
Lavage filtre à bière	2,90	1 053	57	1 641	4,800
Eaux de refroidissement	159,16	—	—	—	—
Divers (lavage locaux, purge chaudières)	42,55	—	—	—	—
Charge totale du mélange des eaux	230,00	32,4	2,19	218	50,155*

* Soit un équivalent en population de 926 habitants par 100 hl de bière fabriquée.

En ce qui concerne la brasserie (tabl. 9) les eaux les plus polluées sont les eaux de lavage des filtres à trouble, des tanks de garde, des filtres à bière et des cuves de fermentation, mais elles sont facilement décantables.

En examinant les tableaux 8 et 9 et en se basant sur l'utilisation de 1,8 tonnes d'orge pour la fabrication de 100 hl de bière, on s'aperçoit que la pollution du poste malterie est faible car elle représente 10,7 p. 100 du poste brasserie.

F. — *Industries de la pomme de terre*

1. *Féculeries.*

Les principales eaux résiduaires de féculerie, industrie saisonnière, comprennent :

1° les eaux de lavage des tubercules de pomme de terre ;
2° les eaux protéiques renfermant des matières solubles, en particulier du gluten.
3° les eaux de lavage de la fécule.

Comme pour les conserveries et les sucreries, les eaux de lavage sont fortement chargées en matières décantables ; aussi sont-elles parfois recyclées.

Les eaux protéiques, selon AMBROSE et REISER (1954), sont riches en matières organiques (DBO 5 400) et leur volume représente en moyenne, pour cinq usines des États-Unis, 2 800 litres par tonne de matière première, soit 53 p. 100 de la pollution totale des effluents de féculeries. Elles contiennent par litre 6,5 g de protéines (N × 6,25), 500 mg de fécule, 2 g de sucres, 500 mg de cendres et des acides organiques.

Les eaux de lavage de la fécule (1 400 litres par tonne de matière première), avec une DBO de 1 600, représentent 5 p. 100 de la pollution totale des eaux de féculerie.

TABLEAU 10

Charge polluante des eaux de féculerie de pomme de terre
(AMBROSE et REISER, 1954)

	Valeurs moyennes pour 5 usines	
	Sans la pulpe	Avec la pulpe
Charge spécifique en kg de DCO par tonne de pomme de terre	23,1	—
Charge spécifique en kg de DBO_5 par tonne de pomme de terre .	16,6	29
Équivalent population	307	537

Par contre, la pulpe a une charge polluante élevée (43 p. 100 de la charge totale) ; elle contient 96 p. 100 d'eau et 4 p. 100 de fibre contenant un peu de fécule (40 p. 100 par rapport au poids sec). Séchée, elle peut servir pour l'alimentation du bétail.

Le tableau 10 donne la charge polluante des féculeries étudiées. Lorsque la pulpe n'est pas rejetée, l'équivalent population passe de 537 à 307 habitants par tonne de pomme de terre traitée, soit de 4 296 à 2 456 habitants par tonne de fécule produite. (On extrait environ 12,5 kg de fécule en traitant 100 kg de tubercules).

En France, BRÉBION, CABRIDENC, HURIET (1966) ont étudié les effluents d'une féculerie rejetés

dans un égout urbain ; ils notent par litre une teneur élevée en azote total : 435 mg/l pour une DCO de 8 410 et une DBO_5 de 3 900.

Les eaux résiduaires de féculerie ont également été étudiées par LIEPOLT (1959) en Autriche et RUFFER (1965) en Allemagne.

2. *Autres productions.*

Les industries de la pomme de terre produisent, de plus en plus, des produits élaborés telles les pommes de terre grattées, les chips, la purée déshydratée (DAVIN et GUILBOT, 1968). Ces usines évacuent des eaux de lavage et d'épluchage acides ou alcalines ayant dissous des constituants solubles et contenant des matières en suspension. D'après HOLDSWORTH (1968), une usine américaine évacuerait, par tonne de chips, 8 345 m^3 d'eau résiduaire contenant 11 kg de DBO_5, soit un équivalent en population de 204 habitants.

G. — *Autres industries*

Parmi les autres industries alimentaires relativement importantes, nous parlerons des industries du maïs et plus particulièrement des amidonneries et fabriques de glucose. Ces usines évacuent le même type d'eaux que les féculeries de pomme de terre ; ces eaux sont en particulier riches en composés azotés et certaines usines récupèrent le gluten en tant que sous-produit de la fabrication de l'amidon.

Pour terminer, signalons que les huileries évacuent des eaux résiduaires très chargées.

CONCLUSION

Les méthodes d'évaluation de la charge polluante des eaux résiduaires ont suscité de nombreux travaux ; l'uniformisation des méthodes à l'échelle internationale s'impose, afin de rendre les résultats comparables. Pour les effluents des industries alimentaires, la méthode d'oxydation chimique (DCO), rapide et reproductible, est à recommander, complétée par un calcul du rapport la liant à la DBO. On constate que ces eaux renferment peu de composés difficilement dégradables et peu de substances toxiques. Ces eaux résiduaires déversées dans les rivières sont surtout dangereuses parce qu'elles contiennent en solution des composés organiques dont la métabolisation par les bactéries entraîne une diminution de la teneur en oxygène dissous. Les matières en suspension sont également à prendre en considération, car il y a une dissolution progressive dans l'eau réceptrice des éléments de ces débris végétaux. Parfois ces effluents peuvent provoquer des modifications du pH des eaux lorsque la dilution n'est pas suffisante.

Le volume et la charge polluante de ces eaux sont très élevés ; c'est ainsi que WOODWARD (1962) signale que les industries alimentaires et papetières représentent aux U. S. A. l'équivalent de 82 millions d'habitants.

Leur épuration est coûteuse à cause du caractère saisonnier de la plupart de ces industries et de leur dispersion. Cette épuration sera rendue obligatoire par la mise en application de la loi du 16 décembre 1964 ; comme les redevances prévues sont à la fois proportionnelles à la consommation et au rejet des matières polluantes, des solutions s'imposent.

On peut soit recycler une partie de ces eaux pour diminuer la consommation, soit les stocker pour permettre un rejet à faible débit toute l'année afin de diminuer la « redevance pollution ».

On peut aussi éliminer partiellement ou totalement les substances polluantes par un procédé d'épuration biologique ou par épandage sur champ.

Nous reviendrons ultérieurement sur le problème de l'épuration de ces eaux ; signalons cependant que l'on peut rentabiliser dans une certaine mesure le traitement :

— soit par la récupération de produits : acide tartrique dans les vinasses de vin, levures de brasserie, gluten d'eaux résiduaires de féculeries ou amidonneries... etc. ;

— soit en les utilisant comme source de carbone pour des cultures de microorganismes (levures en particulier) destinés à la production de protéines alimentaires. La teneur en azote est en général insuffisante pour cultiver ces microorganismes, sauf pour les eaux de féculeries ou d'amidonneries, aussi supplémente-t-on habituellement ces milieux en azote ammoniacal.

Reçu pour publication en janvier 1969.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADELMAN M. H., 1968. Automated measurement of COD. *Water Wastes Eng.*, **5**, 52-55.

AMBROSE T. W., REISER C. O., 1954. Wastes from potato starch plants. *Ind. Eng. Chem.*, **56**, 1331-1334

BAKER-MUNTON M. H., 1964. A quick method of determining 5 days BOD of effluent, especially malting effluent. *Europ. Brew. Conv. Proc. Congr.*, **9**, 497-499.

BALLINGER D. G., LISHKA R. J., 1962. Reliability and precision of BOD and COD determination. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.*, **34**, 470-474.

BEECKMANS I., DEVLAMINCK P., LEJOUR M., LECLERC E., 1954 Étude des eaux résiduaires de malteries. *Bull. Cebedeau*, **26**, 216-225.

BEECKMANS I., LEHAEN J., PHILIPS L. P., DEVLAMINCK F., GHYSSAERT L., VAN DE KEERL , LECLERC E., 1954. Étude des eaux résiduaires de brasserie. *Bull. Cebedeau*, **23**, 2-31.

BIDAN. Communication personnelle.

BOUQUIAUX J., 1963. Commentaire de la méthode normalisée en Belgique pour la mesure du BOD. *Bull. Cebedeau.*, **232**, 124-126.

BREBION G., CABRIDENC R., HURIET B., 1966. Influence de l'apport d'un effluent saisonnier d'industrie agricole sur le fonctionnement d'une station d'épuration d'eau usée urbaine. *Bull. Cebedeau.*, **275**, 3-18.

CALDWELL D. H., LANGELIER W. F., 1948. Manometric measurement of the biochemical oxygen demand of sewage. *Sewage Works J.*, **20**, 2, 202-218.

CLARK J. W., 1960. Continuous recording BOD determination. *Wat. Sewage Works* **107**, 140-145.

CORDEBARD H., 1942. *L'oxydation chromique en analyse quantitative.* 149-155, 178. Société d'impressions typographiques Nancy 149-155, 178.

DAMM H., 1964. Abwasseraufgaben und probleme in der Süsmosterel. *Flussiges Obst.*, **31**, 498-502, 547-550, 609-613.

DAVIN A., GUILBOT A., 1968. Problèmes posés par l'utilisation industrielle de la pomme de terre. Principales directions de recherches. *Industr. aliment. agric.*, **11**, 1501-1511.

DEVILLERS P., 1968. L'eau en sucrerie. I. Réduction de la pollution et de la consommation d'eau fraîche *Sucr. fr.*, **109**, 95-99.

DEVILLERS P., LEMAITRE A., DEYRAND M. F., 1967. Détermination de la demande chimique en oxygène. *Sucr. fr.*, **108**, 288-331.

DITTRICH V., 1966. Abwasserentstchung. Abwasserzusammensetzung und abwasserreinigung in der Süsmostund obstgetrankeindustrie. *Flussiges Obst.*, **33**, 518-520, 522-524.

DOBBS R. A., WILLIAMS R. T., 1963. Elimination of chloride interference in the chemical oxygen demand test. *Anal. Chem.*, **35**, 1064-1067.

EDELINE F., LAMBERT G., BINET W., FATTICIONI H., 1967. Étude des eaux résiduaires de conserverie. Comparaison de deux procédés d'épuration : l'aspersion et le fossé d'oxydation. *Bull. Inacol*, **18**, 112-143.

EDELINE F., LAMBERT G., HEUZE R., 1965. Étude des eaux résiduaires de conserverie. *Bull. Cebedeau*, **257**, 192-195.

ELDRIDGE E. F., 1947. Industrial wastes in canning industry. *Ind. Eng. Chem.*, **39**, 619-624.

EYE J. D., RITCHIE C. C., 1961. Measuring BOD with membrane electrode system. *J. Wat. Pollut. Cont., Fed.*, **38**, 1430-1440.

FEARN R. J., HETHERINGTON W. H., JAECKEL S. M., WARD C. D., 1967. A reduced scale method for determination of the dichromate value (Chemical oxygen demand) of sewage and trade effluents. *J. Soc. Dyers Colour.*, **83**, 146-151.

FLANZY M., 1936. Les vinasses des distilleries vinicoles. *Rev. Vit.*, **85**, 21-26 ; 37-44 ; 53-58.

FLANZY M., MAUGENET J., BENARD P., MOURGUES J., 1967. Contribution à l'étude du traitement des vinasses des distilleries vinicoles. *C. R. Acad. Agric.*, 11088-96.

FORD D. L., 1968. Total organic carbon as a waste water parameter. *Public works.*, **99**, 89-92.

FOULDS J. M., LUNSFORD J. V., 1968. An analysis of the COD method. *Wat. Sew. Works.*, **3**, 112-115.

GELLMAN I., HENKELEKIAN I., 1951. Studies of biochemical oxidation by direct methods. I. Direct method for determing BOD. *Sewage Ind. Wastes*, **23**, 1267-1281.

HOLDSWORTH 1968 : Effluent from fruit and vegetable procesing *Process. biochim.*, **3**, 27-31.

HURIET B., ROGEON M. (M^lle), 1965. Réflexions sur les méthodes d'estimation de la charge polluante des eaux industrielles, in *La pollution des eaux. Quelques problèmes d'actualité.* (Journée de la pollution des eaux, Paris, avril 1965). Édition Eyrolles et Gauthiers-Villars, 57-74 (publié en 1966).

IMHOFF K., 1964. *Manuel d'assainissement urbain*, Dunod, éditeur, 92, rue Bonaparte, Paris 6^e.

INGOLS R. S., MURRAY P. E., 1948. An oxygen consumed test for sewage. *Wat. Sew. Works.*, **95**, 113-116.

IWASAKI I., HIRAYAMA M., OHMORI T., ONO T., 1966. Determination of organic carbon in polluted water by periodic acid (en japonais). *Kogyo Yosui*, **91**, 23-28 (in *Chem. Abstr.*, **69**, 89, 566 *j*).

JENKINS D., 1960. The use of manometric met h ods in the study of sewage and trade wastes. In *Waste Treatment*, 99-121 Pergamon Press. Oxford.

JERIS J. S., 1967. A rapid COD test. *Water Wastes Eng.*, **4**, 5, 89-91.

JUDELL T. L., 1965. Effluent treatment in the food processing industries. *Food Technol. Austr.* 446-453.

KAUFMAN S., 1954. The relationship between biochemical oxygen demand in a treated industrial effluent. *Proc. 9th Ind. Waste Conf. Purdue Univ. Ext., Ser.*, **87**, 107,

KLEIN L., 1941. The strength of Sewage : some comparative results. *Proc. Inst. Sewage Purif.*, 174-191

KLOTTER H. E., HANTGE E., 1965. Bemessungsgrundlagen Abwässer aus Winzerbetrieben. *Vom Wasser.*, **32**, 310-346.

LAWTON G. W., 1955. The chemical oxygen demand determination. *Univ. Wisconsin Eng. Expt. Sta. Reprint*, n° 280, 45-56 (in *Chem. Abstr.*, **51**, 3 887 *i*).

LECOQ H 1956. *La cérimétrie appliquée à l'analyse des eaux.* Communication au XXIX^e Congrès International de Chimie Industrielle, Section III, Paris.

LEE E. W., OSWALD W. J., 1954. Comparative studies of the dilution and Warburg method for determining BOD. *Sewage Ind. Wastes*, **26**, 1097-1108.

LEFEBVRE P. H., 1952. Le problème de l'épuration des eaux résiduaires de conserveries de légumes. *XI^e Congr. internation. Industr. agric.* Rome.

LEFRANÇOIS L., 1953. Production de levure alimentaire dans les distilleries. *Industr. aliment. agric.*, 1021. 1031.

LESZCZYNSKI C., SKWARA Z., 1966. Comparison of different methods for chemical oxygen demand determination in the pulp and paper mill waste water (en polonais) Przeglad papier, **22**, 7, 213-215 (in *Chem Abstr.*, **66**, 49-089 *n*).

LIEPOLT R., 1959. Pollution des cours d'eau par les eaux résiduaires des industries alimentaires. *Bull. Cebedeau*, **101**, 142-147.

LIVRE DE L'EAU. 1966. 2^e édition, Volume V. Cebedoc Liège 3, boulevard Frère-Orlan., 395-396.

LOSHAKOV Y. T., PRUSAKOV V. M., 1965. Selection of a procedure for determination of the COD or organic matter (en russe). Vop. Gig. Epidemol. Donbass Donetsk., 130-132 (in *Chem. Abstr.*, **66**, 88-475 *e*).

MAC MILLAN J. D., YORK G. K., VAUGHN R. H., 1959. BOD vs COD methods for determining brandy stillage purification. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **10**, 199-205.

MAC NARY R. R., DOUGHERTY M. H., WOLFORD R. W., 1957. Determination of chemical oxygen demand of citrus waste waster. *Sewage Ind. Wastes.*, **29**, 894-900.

MERCER W. A., ROSE W. W., 1956. Chemical oxygen demand as a test of strength of cannery waste water. *Res. Lab. Rpt.* n° 816, 56 B *Nat. Can. Assn. Res. Lab. West.* Br. Berkeley Calif.

MIHAIL M., MUSETESCU P., 1966. Methods for determining water oxidizability (en roumain). Hidhotei Geospodarirea Apelor Meteorol., **11**, 485-489 (in *Chem. Abstr.*, **66**, 68-719 j).

MOLOF A. H., ZALEIKO N. S., 1964. The detection of organic pollution by automated COD, 19th Purdue Industrial Waste conférence, 7 mai 1964.

MONTGOMERY H. A. C., 1967. The determination of biochemical demand by respirometric methods. *Wat. Res.*, **1**, 631-662.

MOORE W. A., KRONER R. C., RUCHHOFTT C. C., 1949. Dichromate reflux for determination of oxygen consumed. Effectiveness in oxidation of organic compounds. *Anal. Chem.*, **21**, 953-957.

MOORE W. A., LUDZACK F. J., RUCHHOFT C. C., 1951. Determination of oxygen-consumed value of organic wastes. A comparative study of methods. *Anal. Chem.*, **23**, 1297-1300.

MOORE W. A., RUCHHOFTT C. C., 1951. Chemical oxygen consumed and its relationship to BOD. *Sewage Ind. Wastes*, **23**, 705-712.

OPLINGER P. S., 1968. Methods for estimating oxygen demand of liquid peach waste. *J. Food Sci.*, **32**, 675-677.

POBIS I. J., 1968. L'équivalent habitant des villes modernes comme valeur fondamentale pour le calcul des stations d'épuration. *Trib. Cebedeau*, **21**, 438-447.

POPEL F., HUNKEN K. H., STEINECKE H., 1958. Gas-u Wassfach (Wasser-Abwasser), **99**, 897-902.

POPESCU V., MIHAIL M., REVENCO P., 1968. La digestion anaérobie des eaux résiduaires de la fabrication de l'alcool et de la levure comprimée. *Trib. Cebedeau*, **21**, 139-145.

RODIER J., 1966. *L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau ; eaux naturelles, eaux usées.* 3e édition Dunod, Paris.

RUFFER H., 1965. *Les eaux usées de l'industrie alimentaire et ses possibilités d'épuration* in *La pollution des eaux. Quelques problèmes d'actualité.* (Journées de la pollution des eaux. Paris. Avril 1965). Éditions Eyrolles et Gauthiers-Villards, Paris 91-117 (paru en 1966).

SCHELTINGA H., 1968. Le traitement des eaux résiduaires dans l'industrie de l'alimentation. *Trib. Cebedeau*, **21**, 461-465.

SOEIRO J. S., LINHARES DE LIMA A., 1960. Traitement des effluents des installations industrielles de distillation de vin. *Bull. Cebedeau*, **48**, 149-152..

Standard Methods for the examination of water and waste water, 9th ed, New York, *American Public Health., Ann. Inc.* 1956, 122-124 (oxygen consumed from permanganate).

Standard Methods for the examination of water and waste water 12th ed, New York, *American Public Health Ann. Inc*, 1965, 410-424 (Biochemical oxygen demand), 510-514 (Chemical oxygen demand).

STENGER V. A., VAN HALL C. E., 1967. Rapid method for determination of chemical oxygen demand. *Anal. Chem.*, **39**, 206-211.

SUBRAHMANYAM R. P. V., SASTRY C. A., PILLAI S. C., 1959. Determination of the permanganate value for waters and sewage effluents containing nitrite. *Analyst.*, **84**, 731-735.

SYMONS J. M., MCKINNEY R. S., HASSIS H. H., 1960. A procedure for determination of the biological treatability of industrial wastes. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.*, **32**, 841-852.

TOGASHI T., HIRAYAMA M., 1966. Determination of organic carbon in polluted water (en japonais) *Kogyo Yosni*, **91**, 29-33 (in *Chem. Abstr.*, **69**, 61, 392 *a*).

VAN BENEDEN G., 1962. Passé, présent et avenir du BOD. *Bull. Cebedeau*, **229**, 615-624.

VAUGHN R. H., MARSH G. L., 1953. Disposal of California winery wastes. *Ind. Eng. Chem.*, **45**. 2686-2688.

VAUGHN R. H., YORK G. K., KLEMMICK M. F., DAVIS D. L., 1958. Pretreatment of brandy stillage for disposal in a municipal waste treatment plant. *Food Res.*, **23**, 297-304.

VERNIMMEN A. P., HENKEN E. R., LAMB J. C., 1967. A short term biochemical oxygen demand test. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.*, **39**, 1006-1020.

VOGL K., SCHUMANN G. S., PETERS G., 1965. Eine Methode zur schnellen Bestimmung des BSB_5 im abwasser. *Monatsschrift für Brauerei.*, 166-169.

VOGL K., SCHUMANN G., WERNER J., 1966. Beziehungen des chemischen sauerstoffbedarfs nach der bichromat methode zum biochemischen sauerstoffbedarf (BSB_5). *Die Branntweinwirtschaft.*, 620-624.

WAGNER R., 1966. Bestimmung der chemischen oxidierbarkeit nach der dichromat. Methode (COD) mit hilfe des kontinuierlichen Digestors. *Symp. Europ. Technicon* Paris. 2, 3 et 4 novembre 1966.

WARCOLLIER G., 1930. Sur le traitement des eaux résiduaires de distilleries de pomme. *Ann. Brass. Dist.* **22**, 344-347, 361-363.

WEBB F. C., 1964. *Biochemical Engineering.*, 706-707. Van Norstrand company Ltd, Londres.

WOODWARD R. L., 1962. Pollution caused by food paper wastes. *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, **54**, 291-293.

YOUNG J. C., GARNER W., CLARK J. W., 1965. An improved apparatus for biochemical oxygen demand *Anal. Chem.*, **37**, 784.

ZALEIKO N. S., MOLOF A. H., 1963. Automation of chemical oxygen demand. *Proc. 9th nation. Analysis Instrumentation symp.* Houston.

ZANONI A. E., 1967. Wastewaterdeoxygenation at different temperatures *Wat. Res.*, **1**, 453-466.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (1), 67-68.

CHRONIQUE DES LIVRES

ACTIVITÉS ENZYMATIQUES ET TECHNOLOGIE DES DENRÉES ALIMENTAIRES. — Paris, 23-26 janvier 1967. — Paris, Centre national de la Recherche scientifique, Coll. « Les journées scientifiques du Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation », 1968, 552 p.

Ce volume donne les textes complets des exposés présentés au cours des Journées organisées en janvier 1967 par le Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation.

YON (J.). — Sites actifs des enzymes et mécanisme de la catalyse enzymatique.
GALZY (P.), BIZEAU (C.), VEZINHET (F.). — Les enzymes de la levure. Facteurs agissant sur leur production et leurs caractères.
URIEL (J.). — Les isoenzymes.
GUILBOT (A.). — Activités enzymatiques en milieu peu hydraté.
BEAUFRAY (H.). — Localisation des enzymes dans les divers composants de la cellule.
BOIDIN (C.). — Fabrication industrielle des enzymes.
ULRICH (R.), HARTMANN (C.). — Enzymes et maturation des fruits.
FLANZY (M.). — Vues générales sur les enzymes dans la technologie des boissons.
POUX (C.). — Enzymes oxydatifs dans le raisin.
MARTEAU (G.) — Les enzymes protéolytiques et la technologie du raisin et de la pomme.
CORDONNIER (R.). — Les protéases de *Saccharomyces cerevisiae* ; leur intérêt technologique.
SCRIBAN (R.). — Les enzymes de l'orge et du malt.
MERCIER (Ch.), COLAS (A.). — Les amylases en panification.
PETIT (L.), AUDIDIER (Y.). — Action des protéinases dans les industries de cuisson.
SANDRET (F.), MICHIELS (L.). — Enzymes et évolution de la valeur industrielle des pommes de terre.
DRAPRON (E.), UZZAN (A.). — Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux.
ROSSET (R.), ROZIER (J.). — Problèmes enzymatiques concernant les viandes : maturation, procédés divers de conservation.
GARNIER (J.), MOCQUOT (G.), RIBADEAU-DUMAS (B.), MAUBOIS (J.-L.). — Coagulation du lait par la présure : aspects scientifiques et technologiques.

H. BONJEAN, J. CHOUILLOU, J.-C. DISCHAMPS, F. DUBIN, R. P. de FARCY, L. GUIBERT, R. NÉRSON, R. PARRAT, A. PILLET, C. QUIN, P. REYMOND, R. SAVATIER, S. SPINEDI. — COMMERCIALISATION DES DENRÉES ALIMENTAIRES D'ORIGINE AGRICOLE. — Paris, Dunod, Coll. « Bibliothèque d'Administration des entreprises », 1969, 187 p.

Ce livre contient une série d'études relatives aux denrées alimentaires, envisagées tant du point de vue des producteurs que de celui des industries alimentaires et des commerces alimentaires de type capitaliste ou groupés en coopératives. Effectuées par des universitaires, des agriculteurs, des coopérateurs, des représentants des industries alimentaires et des représentants des pouvoirs publics (Ministère de l'Agriculture notamment) ces études ont été exposées et discutées au cours d'un colloque organisé et dirigé par le Professeur MURAT de l'I. E. E. de Lyon, en collaboration avec l'Association nationale des docteurs ès sciences économiques (section d'économie rurale) et l'Association lyonnaise des docteurs ès sciences économiques, avec l'appui du Ministère de l'Agriculture et des organisations professionnelles agricoles et des coopératives.

Les problèmes de la commercialisation y sont présentés comme rattachés au problème fondamental du revenu des agriculteurs. Des exemples de commercialisation réussie (lait, vin) sont exposés, puis les problèmes essentiels : marketing, rôle des industries et commerces alimentaires, rôle des coopératives, sont présentés.

Cet ouvrage devrait intéresser les économistes, hommes politiques responsables des organisations professionnelles, industrielles, commerciales et agricoles, journalistes et, individuellement, les agriculteurs et dirigeants d'entreprises de la chaîne de l'alimentation.

INFORMATIONS

VIIIe CONGRÈS INTERNATIONAL DE NUTRITION

Prague, 28 août - 5 septembre 1969

Le Congrès est organisé par l'Union internationale des Sciences de la Nutrition et par la Société médicale tchécoslovaque. Il sera présidé par le Professeur Joseph MAŠEK.

Huit thèmes ont été retenus :

— Aspects biochimiques de la Nutrition.
— Mécanismes métaboliques dans l'homéostasie et la croissance.
— Nutrition et état de santé.
— Carences secondaires — aspects cliniques.
— Études nutritionnelles dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement.
— Hygiène alimentaire.
— Valeur nutritive et technologie alimentaire.
— Production des aliments.

Les renseignements pourront être obtenus aux adresses suivantes :

M. le Professeur TERROINE, Directeur du Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation
C. N. R. S.
71, Boulevard Péreire, Paris (17e)

ou,

Secrétariat général du VIIIe Congrès international de la Nutrition
Institut d'Alimentation humaine
Budějovická 800, Prague 4 (Tchécoslovaquie)

LES EAUX RÉSIDUAIRES DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES

XII^e SYMPOSIUM INTERNATIONAL (*)

Budapest, du 9 au 14 mars 1970

Organisé par la Commission internationale des Industries agricoles et alimentaires (C. I. I. A.)
18, Avenue de Villars, 75 - Paris, 7^e
et le Bureau international permanent de Chimie analytique (BIPCA), même adresse

avec le concours
de l'Association scientifique des Industries alimentaires de Hongrie, METE
Akademia ut 1-3, Budapest V

I. — Les eaux résiduaires : Leurs caractéristiques, les dangers de leur rejet dans le milieu naturel.

II. — Méthodes d'épuration : Aspects techniques, hygiéniques et économiques. Possibilités de recyclage et d'utilisation agricole.

III. — Contrôle des effluents : Analyse et normes d'épuration. Aspects internationaux de la pollution des eaux fluviales par les eaux résiduaires des industries agricoles et alimentaires.

IV. — Mesures législatives : La protection des eaux de surface contre la pollution par les eaux résiduaires industrielles.

(*) Pour des raisons matérielles d'organisation, cette manifestation, prévue pour mars 1969, a dû être reportée en 1970.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatres langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.;* le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à limpression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.
Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des produits végétaux, 11 - Narbonne France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 7-1969

Dépôt légal: 3e trimestre 1969. N° d'impression: 346.